

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Милена Ж. Милановић

**ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА РАЗЛИЧИТИХ
ТРЕТМАНА ПОЧЕТНЕ КАРИЈЕСНЕ ЛЕЗИЈЕ
ГЛЕЂИ НА ФОРМИРАЊЕ БИОФИЛМА,
АДХЕЗИЈУ И ВИЈАБИЛНОСТ ЋЕЛИЈА
ХУМАНЕ ГИНГИВЕ И ВРЕДНОСТИ
МИКРОТВРДОЋЕ ГЛЕЂИ**

докторска дисертација

Београд, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Milena Ž. Milanović

**EFFECT OF DIFFERENT INITIAL ENAMEL
CARIES LESION TREATMENTS ON BIOFILM
FORMATION, HUMAN GINGIVAL CELL
ADHESION AND VIABILITY AND
MICROHARDNESS OF ENAMEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

МЕНТОРИ

Проф. др Милош Белоица

Ванредни професор, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Биљана Миличић

Редовни професор, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Зоран Мандинић

Редовни професор, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

Проф. др Јелена Јулоски

Ванредни професор, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

Доц. др Ана Вуковић

Доцент, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

Доц. др Александар Јаковљевић

Доцент, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

Доц. др Бранислава Стојковић

Доцент, Медицински факултет, Универзитет у Нишу

Датум одбране докторске дисертације: _____

Ова докторска дисертација је плод вишегодишњег рада и залагања већег броја истраживача са различитих факултета којима дугујем неизмерну захвалност.

Пре свега, највећу захвалност дугујем својим менторима, проф. др Милошу Белоци и проф. др Биљани Миличић. Захваљујући вашој подршци, стрпљењу и драгоценим саветима сазрела сам на сваком кораку овог пута. Велика је срећа и привилегија учити од вас.

Члановима комисије такође захваљујем на сугестијама, критикама и саветима који су значајно допринели обликовању ове дисертације. Посебну захвалност дугујем проф. др Јелени Јулоски на помоћи у изради и писању како рукописа, тако и радова током читавог истраживачког процеса.

Доц. др Александру Јаковљевићу, доц. др Бошку Тољићу и др сци. Дијани Митић захваљујем на непроценљивој помоћи и посвећености у лабораторијском раду.

Доц. др Милени Радуновић, асист. др сци. Сањи Петровић и асист. др Тамари Влајић Товиловић захваљујем на саветима и залагању током спровођења микробиолошког дела истраживања.

Проналажење одговарајућег начина за формирање артифицијелних каријесних лезија представљало је кључни корак. Стога, велику захвалност дугујем прим. мр сци. Биљани Анђелски Радичевић на помоћи и упорности.

Проф. др Весни Радојевић, проф. др Милошу Петровићу (Технолошко-металуришки факултет, Универзитет у Београду) и проф. др Владимиру Павловићу (Пољопривредни факултет, Универзитет у Београду) захваљујем на сарадњи и могућности да део експеримената спроведемо у њиховим лабораторијама.

Велику захвалност дугујем колективу Клинике за дечју и превентивну стоматологију на пруженој подршци. Доц. др Душану Косановићу захваљујем на несебичном дељењу знања и ангажовању током прикупљања одговарајућих материјала, а специјализантима наше Клинике и др сци. Иви Илић на помоћи при сакупљању узорака.

Најзад, желим да се захвалим својој породици и пријатељима који су били уз мене на овом нимало једноставном путу. Бескрајно сам им захвална на разумевању, стрпљењу и подршци.

Дисертацију посвећујем мајци и сестри, као и оцу, кога увек носим у срцу и мислима.

Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи

САЖЕТАК

Увод: Почетне каријесне лезије глеђи, које се у научној и стручној литератури најчешће означавају као беле мрље, представљају први клинички знак каријесног процеса. Неинвазивни третмани су основа терапије белих мрља чији је циљ заустављање каријесног процеса и подстицање реминерализације глеђи. Микроинвазивни приступ у третману белих мрља представља инфилтрација нисковискозном композитном смолом. Доступни подаци из литературе указују на постизање значајног терапијског ефекта након примене ових смола. Међутим, уочава се потреба за даљим испитивањем њиховог утицаја на друге карактеристике глеђи, као што је микротврдоћа глеђи, храпавост површине, дубина пенетрације, пријемчивост за различите микроорганизме.

Циљ: Утврдити успешност примене различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи и њихов утицај на одређене микроорганизме и ћелије гингиве.

Материјал и методе: *In vitro* пилот студија је спроведена у циљу одабира одговарајућег раствора за формирање артифицијелних белих мрља. Даље истраживање је обухватило испитивање: (1) Морфолошких промена глеђи након различитих третмана беле мрље методом скенинг електронске микроскопије (СЕМ); (2) Микротврдоће глеђи; (3) Пријемчивости за формирање биофилма (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*); (4) Утицаја на фибробласте гингиве. У свакој од наведених целина, зуби су разврстани у пет група методом случајног узорка: Група А – Интактна површина глеђи; Група Б – Зуби са артифицијелном белом мрљом; Група Ц – Бела мрља третирана висококонтрованим лаком са флуоридима; Група Д – Бела мрља третирана пастом са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом; Група Е – Бела мрља инфилтрирана нисковискозном композитном смолом. Анализа микротврдоће је спроведена *Oliver Pharr* методом. Испитивана је пријемчивост за формирање мономикробног биофилма референтних сојева микроорганозама: *Streptococcus mutans* (АТСС 25175) и *Candida albicans* (АТСС 10231). Квантификација биофилма вршена је бројањем колонија по милилитру узорка и методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену. За процену ћелијске вијабилности коришћен је тест митохондријалне активности.

Резултати: Раствор састављен од калцијум хлорида, монокалијум фосфата и сирћетне киселине, са рН вредношћу 4,4 и дужином излагања од 96 сати је коришћен за формирање артифицијелних белих мрља. Највеће вредности микротврдоће глеђи уочене су у групи А (здрава глеђ) и у групи Е (композитном смолом третиране беле мрље). Испитивање пријемчивости за формирање биофилма бактерије *Streptococcus mutans* је показало различите вредности међу испитиваним групама: статистички значајна разлика је утврђена између групе Б и групе Д, затим између група Ц и Д и групе Е ($p < 0,05$). Испитивањем пријемчивости површине за формирање мономикробног биофилма (*Candida albicans*), уочена је статистички значајна разлика у броју овог микроорганизма ($p < 0,05$). Утврђено је да је површина беле мрље инфилтриране композитном смолом статистички значајно пријемчивија за формирање овог

мономикробног биофилма у односу на преостале групе. Тест митохондријалне активности је показао да не постоји статистички значајна разлика група Б, Д, Е у односу на контролну групу А, али постоји статистички значајна разлика између групе А и групе Ц ($p=0,018$).

Закључци: Раствор за деминерализацију састављен од калцијум хлорида, монокалијум фосфата и сирћетне киселине, са рН вредношћу 4,4 и дужином излагања од 96 сати је довео до формирања белих мрља одговарајућих особина. Инфилтрација почетних каријесних лезија глеђи нисковискозном композитном смолом значајно повећава микротврдоћу глеђи у односу на вредности микротврдоће белих мрља. Беле мрље третиране пастом са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом су биле најмање пријемчиве за формирање биофилма *S. mutans*. Беле мрље инфилтриране нисковискозном композитном смолом су показале највећу пријемчивост за формирање биофилма *C. albicans*. Испитивана средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи нису неповољно утицала на вијабилност фибробласта гингиве. Лак са флуором је показао највећи проценат вијабилности фибробласта гингиве.

Кључне речи: беле мрље, лак са флуором, казеин фосфопептид аморфни калцијум фосфат, композитна смола, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, фибробласти, вијабилност, микротврдоћа

Научна област: Стоматолошке науке

Ужа научна област: Превентивна и дечја стоматологија

УДК број:

Effect of different initial enamel caries lesion treatments on biofilm formation, human gingival cell adhesion and viability and microhardness of enamel

ABSTRACT

Introduction: Initial enamel caries lesions, in scientific literature referred as white spot lesions (WSL), represent the first clinical sign of the caries process. Non-invasive treatments are the cornerstone therapy for white spot lesions, aiming to arrest the caries and promote enamel remineralization. A microinvasive approach in the treatment of white spot lesions is the infiltration with low-viscosity composite resin. Available literature data indicate the achievement of a significant therapeutic effect following the application of low-viscosity resins. However, there is the need for further investigation of its effects on other enamel characteristics, such as surface roughness, enamel microhardness, depth of penetration, susceptibility to biofilm formation.

The aim: To evaluate the effect of different agents used in the treatment of initial enamel caries lesions, as well as their impact on specific microorganisms and gingival cells (fibroblasts).

Materials and methods: An *in vitro* pilot study was conducted to determine the optimal demineralization solution for the formation of artificial white spot lesions. The study consisted of four segments: (1) evaluation of enamel morphological changes following different white spot treatments using scanning electron microscopy (SEM); (2) assessment of enamel microhardness; (3) analysis of susceptibility to biofilm formation (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*); (4) evaluation of the effects on human gingival fibroblasts. In each segment, the teeth were randomly allocated into five groups: Group A – intact enamel; Group B – artificial WSL; Group C – artificial WSL treated with fluoride varnish; Group D – artificial WSL treated with a paste containing amorphous calcium phosphate–casein phosphopeptide; Group E – artificial WSL infiltrated with low-viscosity composite resin. Enamel microhardness was measured using the *Oliver–Pharr* method. Susceptibility to monomicrobial biofilm formation was evaluated using reference strains *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Candida albicans* (ATCC 10231). Biofilm quantification determined by colony-forming units per milliliter (CFU/mL) and by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Cell viability was assessed using a mitochondrial activity assay.

Results: A demineralization solution composed of calcium chloride, monopotassium phosphate, and acetic acid, with a pH of 4.4 and an exposure time of 96 hours, was used for the formation of artificial white spot lesions. The highest enamel microhardness values were observed in Group A (sound enamel) and Group E (white spot lesions treated with composite resin). The surface of white spot lesions treated with composite resin infiltration showed significantly higher susceptibility to *C. albicans* biofilm. The lowest percentage of mitochondrial activity was recorded in Group E (86.59%; standard deviation: 11.44%). No statistically significant differences were found between Groups B, D, and E compared to the control Group A; however, a statistically significant difference was observed between Group A and Group C ($p = 0.018$).

Conclusions: The demineralization solution used for the formation of artificial white spot lesions, composed of calcium chloride, monopotassium phosphate, and acetic acid at appropriate concentrations (pH 4.4; exposure time of 96 hours), resulted in the formation of lesions with adequate characteristics. Infiltration of initial enamel caries lesions with a low-viscosity composite resin

significantly increased enamel microhardness compared to that of untreated white spot lesions. Treatments with fluoride varnish and casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate paste showed comparable enamel microhardness values; however, no statistically significant increase was observed compared to white spot lesions. White spot lesions treated with casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate paste demonstrated the lowest susceptibility to *Streptococcus mutans* biofilm, while lesions infiltrated with low-viscosity composite resin showed the highest susceptibility to *C. albicans*. The tested agents did not adversely affect the viability of human gingival fibroblasts. Fluoride varnish showed the highest percentage of gingival fibroblast viability.

Keywords: white spot lesion, fluoride varnish, casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate (CPP-ACP), *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, fibroblast, viability, microhardness

Scientific field: Dental Sciences

Scientific subfield: Preventive and Pediatric Dentistry

UDC number:

Садржај

1. Увод.....	1
1.1. Савремено схватање и распрострањеност каријеса.....	2
1.2. Етиологија каријеса.....	4
1.3. Структура и особине глеђи.....	5
1.4. Почетне каријесне лезије глеђи (беле мрље).....	6
1.4.1. Савремени приступ у терапији белих мрља.....	8
1.4.2. Значај флуорида у превенцији и профилакси каријесних лезија.....	9
1.4.3. Казеин фосфопептид-аморфни калцијум фосфат у превенцији каријеса.....	12
1.4.4. Примена нисковискозних смола у терапији белих мрља.....	12
1.5. Утицај средстава која се користе у терапији белих мрља на микроорганизме денталног плака.....	14
1.6. Утицај средстава која се користе у терапији белих мрља на ћелије гингиве.....	16
2. Циљеви истраживања.....	18
2.1. Основни и ближи циљеви истраживања.....	19
2.2. Радне хипотезе истраживања.....	19
3. Материјал и методе.....	21
3.1. Избор раствора за формирање артифицијелних белих мрља - Пилот студија.....	22
3.1.1. Испитивани раствори.....	22
3.1.2. Припрема узорака.....	23
3.1.3. Скенинг електронска микроскопија.....	25
3.1.4. Резултати пилот студије.....	26
3.1.5. Избор раствора за формирање артифицијелних белих мрља.....	28
3.2. Расподела узорака.....	28
3.3. Протокол третмана почетних каријесних лезија глеђи.....	28
3.3.1. Примена висококонцентрованог лака са флуором (Fluor Protector S, Ivoclar Vivadent, Шан, Лихтенштајн) – група Ц.....	28
3.3.2. Примена пасте са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом (Tooth Mousse, GC, Токио, Јапан) – група Д.....	29

3.3.3. Примена нисковискозне инфилтрационе смоле (ICON, DMG, Хамбург, Немачка) – група Е.....	29
3.4. Испитивање морфолошких промена глеђи након различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи методом скенинг електронске микроскопије (СЕМ).....	31
3.5. Испитивање микротврдоће глеђи.....	31
3.6. Испитивање пријемчивости површине глеђи за формирање биофилма.....	34
3.6.1. Квантификација формираног мономикробног биофилма бројањем колонија по милилитру узорка (енгл. Colony Forming Units – CFU/ml).....	35
3.6.1.1. Референтни сојеви бактерија и услови раста.....	35
3.6.1.2. Формирање биофилма.....	35
3.6.1.3. Квантификација биофилма (енгл. CFU/ml).....	36
3.6.1.4. Анализа формираног мономикробног биофилма скенинг електрон микроскопијом (СЕМ).....	36
3.6.2. Квантификација микроорганизама методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену.....	37
3.7. Испитивање утицаја различитих третмана глеђи на ћелије хумане гингиве.....	38
3.7.1. Митохондријална активност (МТТ).....	39
3.7.2. Адхезија фибробласта за површину узорака (Скенинг електронска микроскопија).....	39
3.8. Статистичка обрада података.....	40
4. Резултати.....	41
4.1. Морфолошке промене глеђи након испитиваних третмана беле мрље методом скенинг електронске микроскопије (СЕМ).....	42
4.2. Испитивање микротврдоће глеђи.....	47
4.3. Испитивање пријемчивости за формирање биофилма.....	48
4.3.1. Испитивање пријемчивости за формирање биофилма – <i>Streptococcus mutans</i> ... 48	
4.3.1.1. Квантификација <i>Streptococcus mutans</i> бројањем по милилитру узорка (CFU/ml).....	48
4.3.1.2. Квантификација <i>Streptococcus mutans</i> методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену.....	50
4.3.1.3. СЕМ анализа биофилма.....	51
4.3.2. Испитивање пријемчивости за формирање биофилма – <i>Candida albicans</i>	54

4.3.2.1. Квантификација <i>Candida albicans</i> бројањем по милилитру узорка (CFU/ml).....	54
4.3.2.2. Квантификација <i>Candida albicans</i> методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену.....	55
4.3.2.3. СЕМ анализа.....	56
4.4. Испитивање утицаја на ћелије хумане гингиве.....	60
4.4.1. Митохондријална активност (МТТ).....	60
4.4.2. Адхезија фибробласта за површину узорака (СЕМ анализа).....	61
5. Дискусија.....	64
5.1. Избор раствора за деминерализацију.....	65
5.2. Морфолошке промене глеђи испитиване методом скенинг електронске микроскопије.....	66
5.3. Микротврдоћа глеђи.....	67
5.3.1. Избора методе мерења тврдоће глеђи.....	67
5.3.2. Вредности мерења микротврдоће.....	68
5.4. Пријемчивост за формирање биофилма.....	70
5.4.1. Пријемчивост за формирање биофилма <i>Streptococcus mutans</i>	70
5.4.2. Пријемчивост за формирање биофилма <i>Candida albicans</i>	73
5.5. Утицај третмана белих мрља на ћелије хумане гингиве.....	74
5.5.1. Митохондријална активности (МТТ).....	74
5.5.2. Адхезија фибробласта за површину глеђи (СЕМ анализа).....	76
6. Закључак.....	77
7. Литература.....	79
8. Биографија.....	93

1. УВОД

1.1. Савремено схватање и распрострањеност каријеса

Каријес представља један од највећих јавно-здравствених проблема. То је потврђено последњим извештајем Глобалне оптерећености обољењима (енгл. *Global Burden of Disease*), као и саопштењима Светске здравствене организације. Значајно је поменути да је и на првој листи глобалне оптерећености свим обољењима, која је направљена 1990. године, каријес сталних зуба заузимао водеће место. Током претходних деценија, у развијеним земљама, као последица примене препарата са флуоридима, дошло је до смањења броја каријесом захваћених зуба код дванаестогодишњака (1). Истовремено, у мање развијеним земљама, са ниским дохотком и нижим средњим дохотком, истаживања показују већу учесталост каријеса (2). Процењује се да око 2,5 милијарде људи има каријес сталних зуба, а више од 530 милиона деце широм света има несаниране каријесне лезије млечних зуба (1). Последње истраживање о стању оралног здравља деце и омладине у Републици Србији спроведено је 2019. године. Према добијеним резултатима, све здраве млечне зубе има само 20% деце предшколског узраста, а у структури кеп индекса доминирају несаниране каријесне лезије ($\kappa=80\%$). Такође, у овом узрасту, око 11% изниклих првих сталних молара има уочљиву каријесну лезију. Када се посматра школски узраст, све здраве зубе има 36% деце узраста 12 година и 22% деце узраста 15 година. Као и код предшколског узраста, у структури КЕП индекса деце школског узраста најзаступљенији су зуби са несанираним каријесним лезијама (3).

Према доступним научним сазнањима, орална обољења представљају значајан фактор који утиче на целокупно здравље, на психолошке и социјалне аспекте развоја, што се последично одражава на квалитет живота (4, 5). Према Међународном удружењу стоматолога најчешћа обољења усне дупље, каријес и обољења пародонцијума, сврстана су у хроничне незаразне болести (6, 7). Први пут се орална обољења спомињу заједно са осталим хроничним незаразним болестима (дијабетес, кардиоваскуларна, цереброваскуларна, реуматоидна обољења, гојазност) 2011. године када је Генерална скупштина Уједињених нација усвојила „Политичку декларацију о превенцији и контроли масовних хроничних незаразних болести“. У поменутом документу дефинишу се заједнички фактори ризика као и повећани трошкови за терапију ових обољења, како здравствених система, тако и појединаца и њихових породица (8). Током 2021. године, на предлог Међународног удружења стоматолога и Међународног удружења за истраживања у стоматологији, усвојена је резолуција о оралним обољењима која је земљама чланицама дефинисала следеће препоруке (9):

- До 2030. године орално здравље треба укључити у националне стратегије борбе против хроничних незаразних болести и припадајуће буџете;
- Анализа и утицај на заједничке факторе ризика;
- Основне стоматолошке услуге треба да буду у оквиру базичних пакета здравственог осигурања;
- Мултидисциплинарни приступ и јачање одговарајућих кадрова;
- Праћење оралне патологије.

Каријес и компликације каријеса могу довести до промена и негативних последица на нивоу читавог организма. Рано детињство представља кључни период за развој добрих навика у одржавању оралне хигијене и исхрани, будући да се у том узрасту формирају ставови и обрасци

понашања који имају дугорочан утицај на здравље. Развијање оралне патологије код деце утиче на развој како орофацијалне регије, тако и на развој оралних обољења у каснијим периодима живота (3). Савремена стоматологија, упркос научно-технолошком развоју, још увек није довела до смањења оптерећења друштва каријесом и његовим компликацијама (9). Уз то, истраживања указују да је орално здравље једно од најчешће занемариваних здравствених области, посматрано на глобалном нивоу (10).

Кроз историју било је различитих теорија о настанку каријеса. Сам почетак тумачења каријесних промена на зубима везује се још за старе цивилизације и датира 5.000 година пре нове ере. Индустријализација и развитак цивилизације довели су до промена животних навика и каријес постаје све заступљенији. У XX веку се може рећи да достиже врхунац распрострањености. Услед тога, током XIX и XX века каријес је био тема бројних истраживача који су поставили низ теорија о његовом настанку: ендогене, егзогене, протеолитичке, ацидогене, паразитарне (инфективне), ензимске. Прекретницу је представљала Милерова хемијско-паразитарна теорија 1889. године. Тек тада је објашњено да киселине и бактерије заједно учествују у настанку каријеса. Милер је повезао улогу микроорганизама са настанком киселина у усној дупљи и разградњом тврдих зубних ткива. Свакако и његова теорија је имала низ недостатака. Пре свега није могла да објасни стварање биофилма на површини зуба и његове особине.



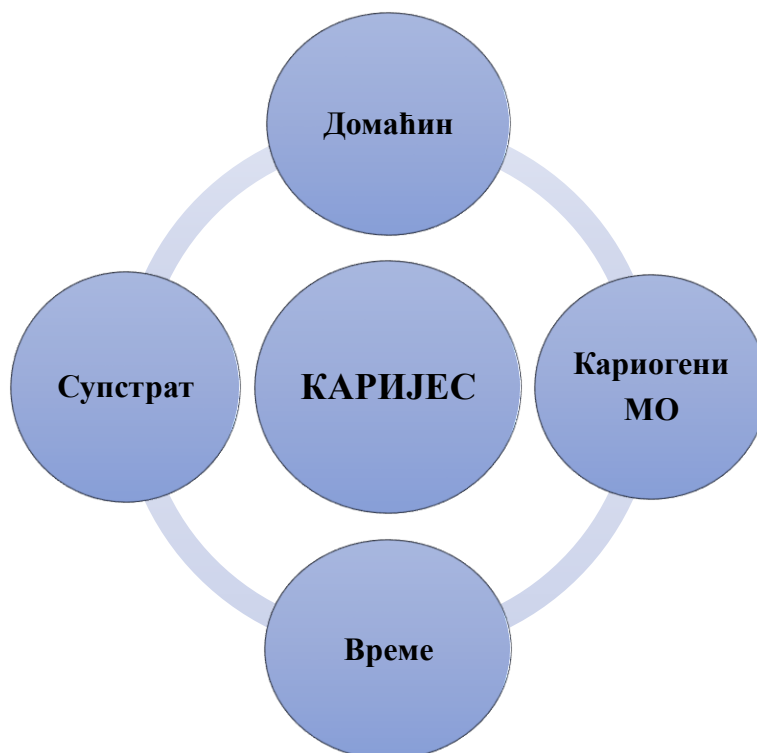
Шема 1. Схватање каријеса и терапијске стратегије: прошлост и савремени приступ (преузето и модификовано од: Innes NPT, Chu CH, Fontana M, Lo ECM, Thomson WM, Uribe S, Heiland M,

Jepsen S, Schwendicke F. A Century of Change towards Prevention and Minimal Intervention in Cariology. J Dent Res. 2019 Jun;98(6):611-617. DOI: 10.1177/0022034519837252).

Класичне теорије су представљале каријес као локалну деструкцију тврдых зубних ткива, иреверзибилног и прогресивног тока. Међутим, ово схватање је превазиђено, будући да представља опис саме каријесне лезије, а не целокупног каријесног процеса. Данас, као што је већ поменуто, каријес се сврстава у хронична незаразна обољења. Уз то, према савременом схватању, каријес представља мултикаузално, реверзибилно обољење, динамичног тока, настало као последица интеракције домаћина, оралног биофилма и ферментабилних угљених хидрата из исхране (10, 11). Дакле, јасно се прави разлика каријеса као сложеног обољења усне дупље и каријесне лезије као последице каријесног процеса. Развој стоматологије довео је до промена у терапији каријеса и окретању ка максималном очувању тврдых зубних ткива и минималним интервенцијама (12) (Шема 1).

1.2. Етиологија каријеса

У сложеној, мултифакторијалној етиологији каријеса, издвајају се четири примарна фактора: домаћин (зуб), кариогени микроорганизми (МО), супстрат (исхрана) и време (Шема 2). Уз то постоји низ секундарних (предиспонирајућих) фактора који утичу на примарне (Табела 1).



Шема 2. Примарни фактори у развоју каријеса.

Дејство секундарних фактора може бити:

- На зуб тј. домаћина: смањење или повећање отпорности глеђи зуба на настанак каријеса;
- На кариогене микроорганизме: смањење или повећање броја микроорганизама и њихове патогености;
- На факторе средине: мењање кариогености супстрата.

Њихово дејство може бити испољено током развоја зуба (пренатално или постнатално), током ницања, на зубе који су изникли или током свих ових фаза.

Табела 1. Секундарни (предиспонирајући) фактори у настанку каријеса (преузето и модификовано из: Мандинић З. Савремено схватање настанка каријеса. У књизи: Мандинић З. (уредник). Превентивна стоматологија. Београд: Издавач Стоматолошки факултет Универзитета у Београду; 2025. 120-131).

Утицај на домаћина	Утицај на узрочника	Утицај на супстрат
Облик зуба	Орална хигијена	Физичке особине хране
Положај зуба	Орална флора	Хемијске особине хране
Састав и структура зуба	Флуориди у денталном плаку	Учесталост уноса хране
Неправилности развоја глеђи	Пљувачка	Клиренс хране из усне дупље
Изложеност флуоридима		
Састав и количина пљувачке		
Исхрана		

Сви ови биолошки механизми су врло комплексни и да би дошло до поремећаја равнотеже у усној дупљи и развоја каријеса, потребно је време. Може се рећи да је велика распрострањеност каријеса последица изостанка здравственог васпитања и формирања неадекватног здравственог понашања. Данас, у савременом схватању каријеса и његове етиологије значајно место припада тзв. микрофакторима, односно оним факторима који утичу на нивоу појединца. У ту групу се сврставају различити социјални, бихејвиорални, клинички фактори и могу деловати заштитно или пак повећати ризик за развој обољења. Наредни ниво посматрања развоја каријеса је на нивоу породице, а засебан део представљају макрофактори који се односе на заједницу или државу (13). Различите студије указале су на повезаност социјално-економског статуса, пребивалишта и животног стандарда и оралног статуса деце (14).

1.3. Структура и особине глеђи

Глеђ прекрива дентинско-пулпни систем крунице зуба и ницањем зуба, у директном је контакту са оралном средином. Дебљина глеђи није идентична у свим деловима крунице зуба, а мења се у зависности од узраста особе и функције зуба. Најдебља је у пределу квржица бочних

зуба и сечивних ивица предњих зуба и дебљина gleђи се постепено смањује према gleђно-цементној граници. Gleђ представља најбоље минерализовано ткиво људског организма, а према Моховој скали тврдоћа gleђи износи 5 (15). Површина интактне gleђи је глатка и сјајна, а услед неједначене дебљине gleђи и њених оптичких својстава (транспарентности и транслучентности), боја gleђи је одређена бојом дентина.

У саставу gleђи 96% чини неоргански део, док преосталих 4% обухвата воду и органске материје. Хистолошки гледано, gleђ се састоји од кристала хидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) који су густо спаковани формирајући gleђне призме. Gleђне призме су пречника 4-6 μm , постављене су у виду паралелних снопова који се пружају од gleђно-дентинске границе до површине gleђи. На попречном пресеку, gleђне призме имају облик кључаоница. Уколико се посматра грађа кристала хидроксиапатита, распоред јона калцијума, фосфата и хидроксилног јона у простору даје кристалу хексагоналну структуру. Хидроксилни јони се налазе у средини кристала, док се јони калцијума и фосфатне групе просторно смештају око хидроксилних јона. Међукристални простори, унутар gleђне призме, испуњени су водом и органским материјама и управо ови простори представљају дифузионе путеве за киселине и минерале.

Кристална решетка gleђи, поред до сада поменутих јона, има у свом саставу и многе друге – јон натријума, магнезијума, карбоната, флуора, стронцијума итд. Они се могу уградити у решетку током развоја gleђи (процеса амелогенезе) или накнадно, кроз дифузионе путеве gleђи. Ови јони могу имати различити утицај, неки повећавају стабилност кристала, док неки доводе до дестабилизације и представљају *locus minoris resistentiae*. Уградњом флуорида повећава се стабилност кристала и расте отпорност на дејство киселина. Насупрот томе, уградњом магнезијума успорава се раст кристалне решетке хидроксиапатита, док карбонати повећавају растворљивост кристала.

Поред кристала хидроксиапатита, gleђ у свом саставу има и друге форме, као што су калцијум флуорид, флуороапатит, дикалцијум-фосфат-дихидрат и други. Ови минерали имају различит степен растворљивости, односно при истој рН вредности различите форме кристала имају различиту јонску активност. Све ове особине су веома значајне за развој каријесног процеса.

Када се зуб појави у усној дупљи, gleђ је изложена оралној средини и при томе површински слој gleђи очвршћава депоновањем минерала из пљувачке у њену порозну структуру (секундарна матурација gleђи). Овај процес, који је у суштини реминерализација, је изразито динамичан. Период мешовите дентиције је специфичан будући да се истовремено дешава више процеса у усној дупљи деце и представља изазован период за превентивне и дечје стоматологе.

1.4. Почетне каријесне лезије gleђи (беле мрље)

Почетне каријесне лезије gleђи, које се у научној и стручној литератури најчешће означавају као беле мрље, представљају први клинички знак каријесног процеса. У усној дупљи се непрекидно одвија низ динамичних процеса, међу којима је и измена јона из пеликле, биофилма и пљувачке са једне стране и површине gleђи са друге стране. Позната је чињеница да је gleђ

аваскуларно и ацелуларно ткиво. Стога, интактност површине глеђи одржава се равнотежом процеса деминерализације и реминерализације. Пљувачка се, због свог минералног састава, често назива течна глеђ. Способност пљувачке да оралну средину одржи презасићеном минералима у односу на хидроксиапатит глеђи представља повољно окружење за зубе. Ову функцију пљувачка врши помоћу калцијумових и фосфатних јона у свом саставу и пуферског капацитета. Што је већа концентрација калцијумових и фосфатних јона у пљувачци у односу на глеђ, то је пљувачка презасићенија и неће доћи до процеса деминерализације глеђи и обрнуто (16). Уколико се исцрпе хомеостатски механизми пљувачке и равнотежа се поремети у корист деминерализације и поремећај равнотеже траје дужи временски период, долази до формирања почетних каријесних лезија глеђи (Слика 1).



Слика 1. Беле мрље у гингивалној трећини предњих зуба у горњој вилици.

Активне почетне каријесне лезије глеђи су кредасто беле боје и матиране површине. Лезије старе 2-3 недеље могу се уочити након посушивања глеђи, док су лезије које се развијају дуже од тога видљиве и на влажној површини зуба. Ове беле мрље, видљиве и без посушивања, указују на дубље процесе деминерализације који продиру више од половине дебљине глеђи или се пружају до границе са дентином (17).

Хистопатолошка анализа попречног пресека белих мрља показује четири издвојене зоне:

1. Површинска зона
2. Тело лезије
3. Тамна зона
4. Прозирна зона.

Сматра се да су површинска и тамна зона резултат реминерализације и да се шире на рачун тела почетне каријесне лезије глеђи (18, 19). Преостале две зоне, тело каријесне лезије и прозирна зона, су последица процеса деминерализације. Површинска зона је дебљине око 20 – 50 μm . Иако се говори о релативно интактној површини, губитак минерала је присутан (око 10%), а волумен пора износи до 5% (у односу на здраву глеђ где износи 0,1%). Сматра се да ова површинска зона настаје као последица изражене постеруптивне минерализације, таложења минерала из

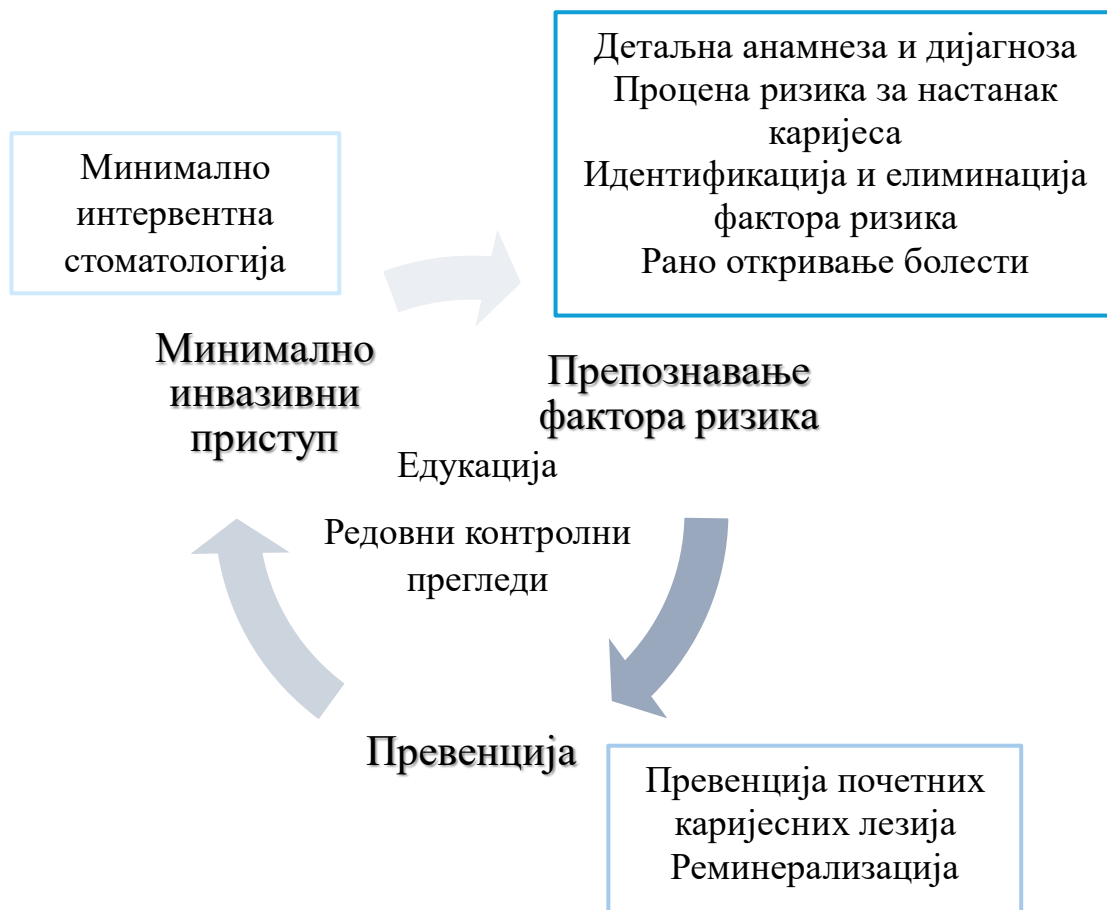
субповршинске зоне и дејства заштитних механизма које је ограничено на саму површину глеђи (20). Централни део беле мрље је заправо тело лезије. Најчешће је троугластог облика, при чему је врх окренут ка глеђно-дентинској граници. У овој зони је најизраженији губитак минерала (10%-50%), а волумен пора се креће до 25% (21). Идући у дубину саме беле мрље, наредна зона је тамна зона где губитак минерала износи око 6%, а волумен пора од 2% до 4%. На граници према здравој глеђи налази се прозирна зона. Ширина варира од 5-100 μm , губитак минерала је око 2%, а волумен пора око 1%. У потврђивању присутног процеса реминерализације у овој зони доприноси налаз повећаних концентрација флуорида, а мањих магнезијума и карбоната (22).

Деминерализација у потповршинском слоју глеђи доводи до повећања позозности, што утиче на оптичке карактеристике глеђи. Ове порозне структуре садрже више ваздуха (индекс преламања светлости 1) и воде (вредност индекса 1,33). Услед поменутих разлика у вредности индекса преламања светлости, почетне каријесне лезије глеђи се виде као кредасто беле површине које се јасно уочавају у односу на околну здраву глеђ (23, 24).

Последњих деценија преваленца белих мрља се повећала. Неки аутори ово повећање доводе у везу са терапијом фиксним ортодонтским апаратима и сматрају да је очување оралног здравља у овим околностима изазов за пацијента (25-28). Током прве четири недеље, од момента поставке фиксног ортодонтског апарата, могу се уочити први знаци каријесног процеса (29). Подаци из литературе указују да адолесценти представљају групу пацијената код којих је најчешће неопходан третман белих мрља (30). Уколико се не уоче правовремено, у реверзибилној фази, ове лезије ће напредовати и доћи ће до настанка кавитета на зубима. Такође, истраживања су показала да беле мрље на предњим зубима имају негативни психолошки ефекат, како код млађе деце, тако и код адолесцената и утичу на њихов ниво самопоуздања (31-34). Истовремено, након успешног третмана почетних каријесних лезија глеђи, запажено је побољшање квалитета живота и стања оралног здравља деце (35).

1.4.1. Савремени приступ у терапији белих мрља

Савремена стоматологија је окренута максималном очувању зубних ткива и тежњи ка минималним интервенцијама. Опсежне рестаурације и принципи макромеханичке ретенције замењени су правовременим превентивним, неинвазивним и минимално инвазивним третманом. Индивидуални превентивни план са контролом ризика за настанак каријеса и раном дијагностиком почетних каријесних лезија глеђи је основа савременог лечења каријеса. Један од стубова концепта минималних интервенција је препознавање фактора ризика за настанак обољења кроз детаљну анамнезу, клинички преглед и укључивање различитих дијагностичких метода (Шема 3). Пацијенти код којих доминирају неповољни услови као што су присуство кариогених микроорганизама у великом броју, исхрана са честим уносом угљених хидрата, смањена заштитна физичка и/или хемијска улога пљувачке, неадекватна орална хигијена, дубоке, уске јамице и фисуре бочних зуба, поремећаји минерализације зуба су у високом ризику за настанак каријеса. Насупрот томе, код пацијената са ниским или средњим ризиком за настанак каријеса, заштитни фактори надвладавају патолошке и омогућавају одржавање хомеостазе усне дупље (36).



Шема 3. Стратегија минимално инвазивног приступа и концепта минимално интервентне стоматологије у терапији белих мрља (преузето и адаптирано од: Banerjee A, Hameed Z, Chohan MA, Patel K, Vaghela JJ, Sheikh F, et al. Minimum intervention oral care - incentivising preventive management of high-needs/high caries-risk patients using phased courses of treatment. Br Dent J. 2024;236(5):379-82. DOI: 10.1177/20501684251327614).

Неинвазивни третмани су основа терапије почетних каријесних лезија глеђи чији је циљ заустављање каријесног процеса и подстицање реминерализације глеђи (27, 37, 38). У оквиру овог концепта примењују се средства за реминерализацију са флуоридима, биоактивни препарати са аморфним калцијум фосфатом (*ACP*), казеин фосфопептидом (*CPP*) и калцијум силикати (39-43).

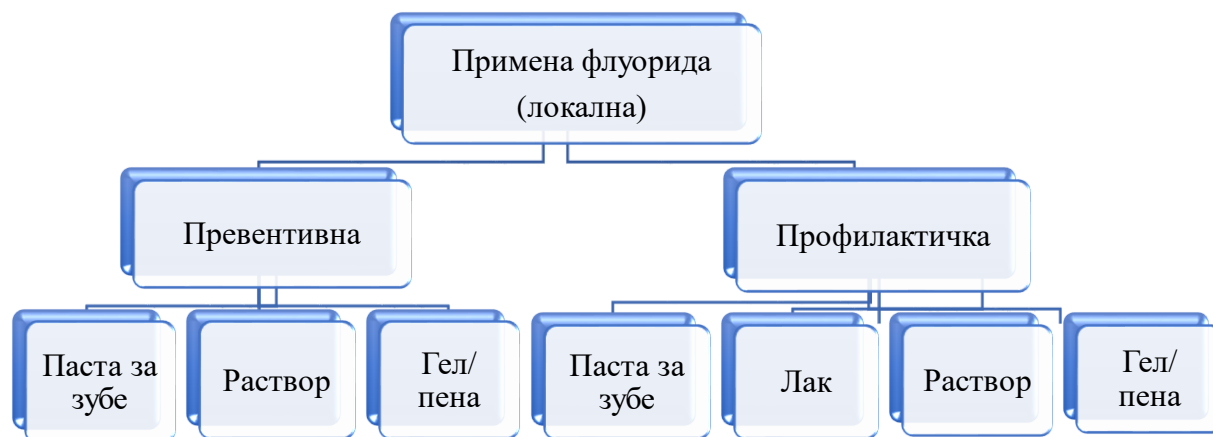
1.4.2. Значај флуорида у превенцији и профилакси каријесних лезија

Највећи допринос смањењу преваленције каријеса током последњих неколико деценија у развијеним земљама приписује се локалној примени флуорида различитих концентрација, који се најчешће користе у облику пасте за зубе, раствора за испирање усне дупље и лакова. (44, 45).

Идеја о примени флуора у стоматологији се јавила почетком двадесетог века. Примећене су промене на зубима (мрље) код људи који су пили воду са вишим садржајем флуора, али су истовремено имали мање каријесних лезија. Нешто касније, од 1930. до 1940. вршена су

различита истраживања која су довела до закључка да концентрација флуора у води за пиће од 1 ppm (1mg F/l) утиче на смањење појаве каријеса, без испољавања нежељених ефеката (46). Ова открића се приписују доктору Хенрију Дину који је тада био на челу Националног института за истраживања у стоматологији у Сједињеним Америчким Државама. Значајно је поменути да је у САД-у, у Мичигену, први пут извршено флуорисање воде за пиће и то представља значајан тренутак у развоју превенције каријеса. Нешто касније (око 1950. године) започиње развој и комерцијална употреба пасте за зубе са флуором.

Флуориди се могу примењивати системски (ендогено) и локално (егзогено). Према концентрацији препарати са флуоридима се деле на нискоконцентроване, средњеконцентроване и висококонцентроване. Још једна од подела може бити на неорганске и органске форме флуора. Најзаступљенији неоргански препарати садрже натријум-флуорид, калај-флуорид, сребродиамин-флуорид, закишељени фосфатни флуорид, натријум-монофлуорофосфат. Аминофлуориди се сврставају у органске флуориде и присутни су на тржишту у виду различитих препарата (пасте за зубе, раствори за испирање уста).



Шема 4. Превентивна и профилактичка локална примена препарата са флуоридима.

Такође, примена препарата са флуоридима се може поделити на превентивну (примена ниских и средњих концентрација у кућним условима) и профилактичку (примена високих концентрација у амбулантним условима) – Шема 4.

Првобитно се сматрало да флуориди свој кариостатични ефекат постижу уградњом у кристале хидроксиапатита глеђи у време амелогенезе, чинећи их тако отпорнијим на деловање киселих метаболита. Међутим, утврђено је да су други механизми важнији. Најзначајнијим механизмом се сматра присуство флуорида у оралној средини (пљувачка, плак, интеркристална течност). Са аспекта савремене стоматологије, присуство флуоридног јона у оралним течностима, на месту где се дешавају процеси деминерализације и реминерализације, представља темељ његовог превентивног дејства. Локално присуство флуора је значајније за смањење растворљивости глеђи, у односу на примарно висок садржај флуора уграђеног у глеђи током амелогенезе. Уколико су присутни флуоридни јони у интеркристалној течности, током дејства

киселина из денталног плака, успешно ће се смањити и/или зауставити деминерализација (47). Присутни у течности око кристала хидроксиапатита, флуориди успешно смањују или заустављају деминерализацију глеђи и истовремено подстичу и убрзавају процес реминерализације. Са јонима Ca^{2+} и PO_4^{3-} граде флуороапатит који је стабилнији и отпорнији на дејство киселина (раствара се при паду рН вредности на 3,5). Такође, инхибирају агрегацију, раст и метаболизам бактерија денталног плака које су значајне за развој каријеса. Локално апликовани флуориди делују као сурфактант будући да смањују површински напон глеђи и на тај начин доводе до смањења бактеријске адхезије на површину зуба. Они смањују и вискозитет пљувачке, чиме потпомажу ефекат спирања са површине зуба. Локалном апликацијом висококонцентрованих флуорида формирају се глобуле калцијум флуорида (CaF_2) на површини глеђи, које служе као споро отпуштајући депои флуорида. Повећањем киселости и падом рН испод 5,5 из глобула се ослобађају јони калцијума и флуора који учествују у реминерализацији глеђи. Ослобођени флуоридни јони из раствореног CaF_2 могу везати H^+ јоне формирајући тако мале молекуле флуоро-водоника (HF), који релативно лако пролазе кроз плак у пљувачку и тако смањују киселост плака (буферска улога F^-). Са друге стране, молекул HF може да дифундује у интеркристалне просторе и тамо веже јоне калцијума (Ca^{2+}) који се ослобађају током деминерализације. На тај начин, дубље унутар лезије могу да се формирају флуороапатит, флуорохидроксиапатит или поново калцијум-флуорид. Ови производи остају заробљени у ткиву и релативно нерастворљиви све док у њиховој близини поново не дође до пада рН вредности. (48, 49). Флуориди имају и антимикуробно дејство захваљујући ометању производње ензима глукозил-трансферазе. Овај ензим омогућава искоришћавање глукозе у биофилму и формирање екстраћелијског полисахарида што даље доприноси повећаној акумулацији бактерија и њиховом међусобном повезивању.

Почетком седамдесетих година прошлог века почели су да се користе висококонцентровани лакови који осигуравају висок ниво флуора у усној дупљи и омогућавају његову апликацију на тешко доступна и каријес ризична места. Захваљујући добром лепљењу лакова за глеђ зуба, омогућен је дужи контакт с површином глеђи и на тај начин продужено је деловање активне супстанце. Истраживања су показала да примену лака деца добро прихватају, али и да је код стоматолога пожељно профилактичко средство (50, 51).

Захваљујући наведеним особинама, али и својој ефикасности, једноставној техници апликације и безбедности, лакови са флуоридима су један од најзаступљенијих препарата за реминерализацију (52). Истраживања су потврдила њихову ефикасност у терапији каријеса - промовисању реминерализације глеђи уз истовремено заустављање даљег процеса деминерализације (53, 54). Међутим, мање података је доступно о утицају лака са флуоридима на адхезију бактерија на глеђ зуба (40).

1.4.3. Казеин фосфопептид-аморфни калцијум фосфат у превенцији каријеса

Казеин фосфопептид-аморфни калцијум фосфат (енгл. CPP-ACP) је постао једно од незаобилазних средстава за реминерализацију глеђи. Истраживачи су још 80-их година прошлог века указали на значај казеина и његову могућу примену у заустављању каријесног процеса. Нешто касније, 90-их година, на Универзитету у Мелбурну у Аустралији развијен је комплекс казеин фосфопептид-аморфни калцијум фосфат. На челу истраживачког тима је био професор Ерик Рејнолдс, а званично је патентиран 1991. године (55). Десетак година касније настаје комерцијални производ тзв. *Recaldent* технологија, који садржи поменути комплекс и то првобитно у облику жвакаћих гума. Касније су развијене пасте и гелови. Једина контраиндикација за њихову примену је алергија на казеин.

Казеин фосфопептид-аморфни калцијум фосфат представља нанокомплекс јона калцијума, фосфата и хидроксилних јона који су стабилизовани казеин-фосфопептидима. Један молекул казеин-фосфопептида (CPP) може везати 25 јона калцијума, 15 фосфатних јона и 5 флуоридних јона. Фосфопептиди, захваљујући бројним фосфосеринским групама, имају могућност да стабилизују калцијум-фосфате у нанокомплекс аморфног калцијум-фосфата. Тиме се спречава његов раст и трансформација у фазу нерастворљивог кристалног калцијум-фосфата, а јони се задржавају у аморфном, биорасположивом облику (56). Нанокомплекс казеински фосфопептид-аморфни калцијум-фосфат (CPP-ACP) лако продире у дентални плак, где се везује за површину бактеријских ћелија, као и за компоненте интраћелијског матрикса. У условима пада рН вредности плака, CPP-ACP делује као пуфер ослобађајући поменуте јоне на површини зуба, који се крећу низ концентрациони градијент ка површини глеђи, доводећи до активирања процеса реминерализације и последичног смањења деминерализације (57, 58). Истраживања су потврдила успешност примене ових препарата у реминерализацији белих мрља, спречавању прогресије каријеса, смањењу осетљивости зуба и побољшању естетског изгледа хипоминерализоване глеђи (42, 59).

Лак са флуоридима и средства са казеин фосфопептидом – аморфним калцијум фосфатом уз правилно одржавање оралне хигијене и корекцију лоших навика у исхрани, су значајан део терапије белих мрља (60-62). Ипак, неопходно је одређено време како би се остварила реминерализација почетних каријесних лезија глеђи и целокупни процес зависи од понашања пацијента и спровођења свих предложених мера. Један од потенцијалних недостатака је немогућност потпуног маскирања белих мрља (29).

1.4.4. Примена нисковискозних смола у терапији белих мрља

Када се појавила идеја о инфилтрацији почетних каријесних лезија глеђи, истраживачи су спроводили различите студије, *in vivo* и *in vitro*, у циљу проналажења адекватног материјала (63-66). На основу добијених резултата, предложени су критеријуми које би требало да задовољи материјал за инфилтрацију: ниска вискозност, хидрофилност, антибактеријски ефекат, нетоксичност, прихватљив естетски исход третмана, могућност полимеризације (67). Испитивана је могућност коришћења заливача и адхезива, али истраживања су показала да ови материјали не

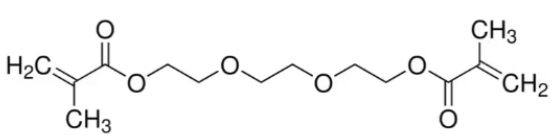
могу продрети у дубље слојеве каријесне лезије глеђи и да долази до њихове дезинтеграције (68). Захваљујући низу нових истраживања, Парис и сарадници су развили савремени материјал који се не може лако дезинтегрисати, има могућност продирања у почетне каријесне лезије глеђи и заптивања пора формираних каријесним процесом (68, 69).

Сва претходно наведена истраживања, довела су до развоја микроинвазивног концепта у терапији белих мрља, који подразумева инфилтрацију белих мрља нисковискозном композитном смолом (69, 70). Захваљујући дејству капиларних сила, ова смола инфилтрира лезију, попуњава поре настале процесом деминерализације у телу каријесне лезије и на тај начин формира дифузиону баријеру унутар саме лезије глеђи. Захваљујући вредности индекса преламања светлости инфилтрационе смоле (1, 46), која је слична здравој глеђи (1,62), долази и до естетског побољшања изгледа беле мрље.

Као што је већ поменуто, микроинвазивни концепт инфилтрације смолом порозних делова глеђи је вођен капиларним силама. На степен инфилтрације утиче волумен пора и капиларни радијус површине која се инфилтрира. Препреку овом концепту је на почетку представљао високоминерализован површински слој глеђи са малим волуменом пора који је представљао баријеру за смолу и спречавао продор у потповршинске порозне зоне (71). Стога, била је неопходна ерозија површинског слоја како би се експонирала лезија испод површине. Парис и Мајер су дошли до закључка да третирање површине беле мрље 15% гелом хлороводоничне киселине у трајању од 90 до 120 секунди даје задовољавајућ ефекат и ствара услове за процес инфилтрације нисковискозном смолом. У циљу елиминисања остатака воде у телу лезије, савремени систем за инфилтрацију обухвата још један корак – третирање површине глеђи 99% етанолом, који следи након третирања лезије хлороводоничном киселином и њеног испирања.

Органски матрикс композитне инфилтрационе смоле је у највећој мери састављен од триетиленгликол диметакрилата (енгл. TEGDMA) (72, 73). Овај мономер карактерише висок степен конверзије и мала молекуларна маса (Табела 2). Још једна значајна карактеристика је ниска вискозност што заправо омогућава добар продор у тело почетне каријесне лезије глеђи. Током развоја ове инфилтрационе смоле, вршена су поређења и разматрано је да ли неки од композитних заливача или адхезива може да оствари сличан ефекат. Међутим, истраживања су показала да инфилтрациона смола са триетиленгликол диметакрилатом има боље особине и већу могућност пенетрације у субповршинске слојеве беле мрље (72, 74).

Табела 2. Особине главног састојка инфилтрационе смоле (*ICON Infiltrant*, DMG, Хамбург, Немачка).

Триетиленгликол диметакрилат (енгл. TEGDMA)	
Хемијска формула	$C_{14}H_{22}O_6$ 
Молекуларна маса	286, 32 g/mol
Изглед	Безбојна течност

Доступни подаци из литературе указују на постизање значајног терапијског ефекта након примене нисковискозних смола (75-77). Поред терапијског ефекта у заустављању почетних каријесних лезија глеђи, остварује се и маскирање беличасте боје лезије. Постиге се тзв. ефекат камелеона при чему се изглед почетне каријесне лезије глеђи усклађује са околним ткивом, тако да се избегава спровођење инвазивнијих терапијских метода (75, 78). Међутим, у доступној научној литератури уочава се потреба за даљим испитивањем утицаја ових смола на друге карактеристике глеђи, као што је храпавост површине, микротврдоћа глеђи, дубина пенетрације (25).

1.5. Утицај средстава која се користе у терапији белих мрља на микроорганизме денталног плака

Према савременој дефиницији, каријес представља динамично и мултифакторијално обољење, посредовано микроорганизмима и ферментабилним угљеним хидратима, а које је у великој мери повезано са дисбалансом оралног микробиома (79, 80). Пријемчивост микроорганизама за специфичне површине у усној дупљи и формирање биофилма на површини зуба и различитих материјала су веома важни у етиопатогенези каријеса, али и обољења потпорног апарата зуба. Биофилм својом структуром и организацијом штити микроорганизме од ћелија имуног система домаћина и антибиотика, тако да је контрола биофилма један од начина за елиминисање оваквог повољног окружења за бактерије и спречавање развоја каријеса.

Streptococcus mutans представља најзначајнију бактерију у сложеном процесу настанка каријеса. Захваљујући тој улози, најчешће је и предмет изучавања. Представља грам позитивну, факултативно анаеробну бактерију чији назив потиче од честих морфолошких варијација (промена облика од овалног до бацила). За њен опстанак у усној дупљи неопходна је површина која нема особину десквамације која карактерише оралну слузокожу. Стога, појављује се тек са ницањем зуба. Најчешће се локализује на местима која су погодна за задржавање плака, као што су јамице и фисуре бочних зуба и апроксималне површине зуба, предоминантно апикално од контактне тачке.

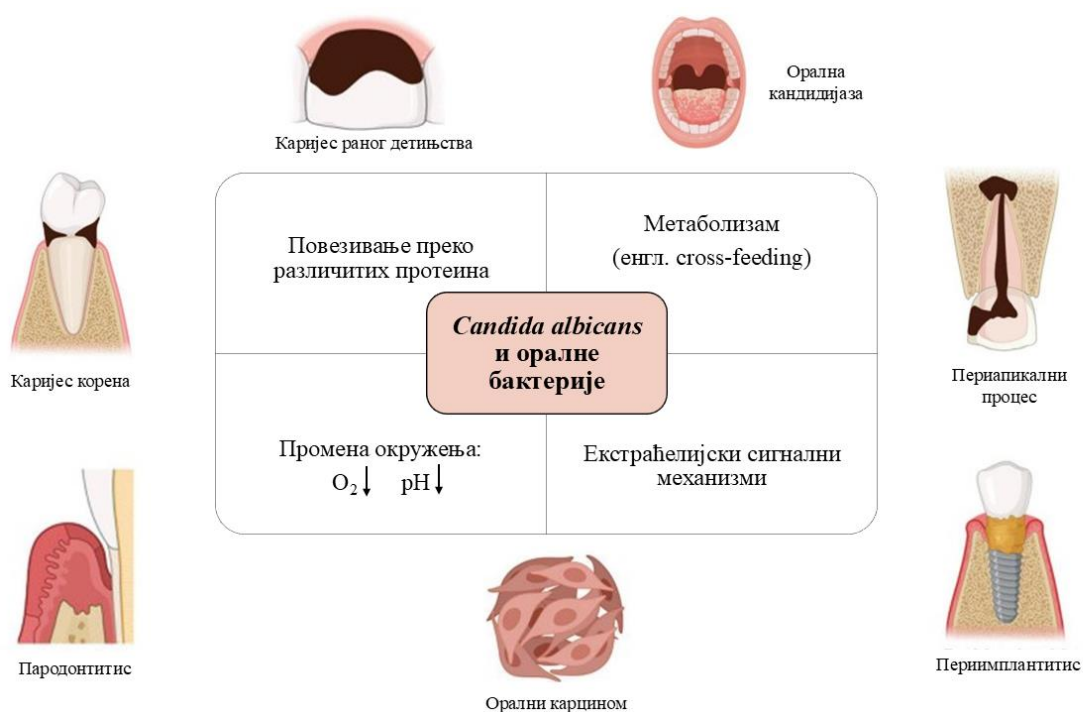
Кариогени потенцијал *Streptococcus mutans* се заснива на три основне карактеристике ових бактерија:

1. Могућност синтезе екстрацелуларних полисахарида: декстрана (од молекула глукозе) и левана (од молекула фруктозе);
2. Могућност транспорта и метаболисања угљених хидрата до киселих продуката;
3. Преживљавање у различитом окружењу и при израженим променама рН вредности – посебно у условима ниских вредности рН (81).

Формирање оралног биофилма је комплексан процес који укључује стварање саливарне пеликуле и њено лепљење на површину зуба или одређених материјала, пасивни транспорт бактерија до површине пеликуле, коадхезију и њихово умножавање. Подаци из литературе указују да *in vitro* модел испитивања формирања биофилма може дати адекватне услове за различита истраживања (82). Претходна истраживања су показала да површинска микроструктура

материјала и површине зуба утиче на бактеријску адхезију, а последично и на формирање биофилма (83).

Велику пажњу истраживача последњих година привлачи синергистичко деловање кариогене бактерије *Streptococcus mutans* и опортунистичке гљивице *Candida albicans* (84). Ове интеракције су значајне у патогенези различитих оралних обољења, као што су каријес, пародонтитис, периимплантитис, орални карциноми (82, 85) – Шема 5. Сматра се да *C. albicans* може имати значајну улогу у развоју каријеса захваљујући својој ацидогеној природи, могућности да формира биофилм, ферментише угљене хидрате и производи одређене ензиме (86). Већина студија показала је да *C. albicans* може модификовати биофилм и повећати његову вирулентност и кариогеност (87-89). Доступна научна литература потврђује везу између ове гљивице и каријеса раног детињства (90). Посебно су важни резултати мета анализе који указују на повезаност веће преваленце каријеса и ове гљивице, како код деце и адолесцената (од 6 до 18 година), тако и код одраслих (37).



Шема 5. *Candida albicans* може имати различите интеракције са оралним микроорганизмима који су укључени у развој оралних обољења (преузето и адаптирано од: Du Q, Ren B, Zhou X, Zhang L, Xu X. Cross-kingdom interaction between *Candida albicans* and oral bacteria. *Front Microbiol.* 2022 Nov 3;13:911623. DOI: 10.3389/fmicb.2022.911623).

Резултати досадашњих истраживања указали су да локална апликација флуорида утиче на смањење пријемчивости *S. mutans* за површину зуба, као и да долази до смањене продукције киселих метаболита (39, 40). Међутим, мање података је доступно о утицају лака са флуоридима на адхезију бактерија на глеђ зуба (60). Већ је поменуто да флуориди ометају производњу ензима глукозил-трансферазе и искоришћавање глукозе у биофилму и формирање екстраћелијских полисахарида, што даље смањује акумулацију бактерија и њихово међусобно повезивање. Према нашим сазнањима, нема доступних података о утицају препарата са флуоридима, казеин

фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом и инфилтрационе смоле на адхезију гљивице *C. albicans* на глеђ зуба.

1.6. Утицај средстава која се користе у терапији белих мрља на ћелије гингиве

Фибробласти представљају ћелије везивног ткива, мезенхималног порекла, које имају кључну улогу у одржавању екстрацелуларног матрикса. Осим улоге у синтези и ремоделовању екстрацелуларног матрикса, фибробласти учествују у секрецији цитокина и фактора раста који имају улогу сигналних молекула. Учествују у одржавању хомеостазе ткива, као и у процесу обнављања ткива након повреда. У одређеним ситуацијама могу послужити као прогениторне ћелије за диференцијацију ћелија мезенхималног порекла (као што су остеобласти или адипоцити током ембрионалног развоја) (91, 92). Први их је описао немачки патолог Рудолф Вирхов 1858. године, уочавајући њихов вретенаст изглед. Неколико деценија након тога (1895. године) Ернест Зиглер препознаје ћелије које учествују у продукцији везивног ткива током зарастања и даје им назив фибробласти (93).

Фибробласти се налазе у гингиви (тзв. гингивални фибробласти – ГФ) и представљају једне од кључних компоненти потпорног апарата зуба које чувају интегритет и структуру ових ткива. Прецизније описано, гингивални фибробласти су локализовани у везивном ткиву које базална мембрана одваја од оралног епитела (лат. *Lamina propria*). Ламина проприја гингиве је изграђена претежно од густих колагених влакана међусобно организованих у снопове. Ова колегана влакана су производи фибробласта. Фибробласти врше и синтезу протеина попут еластина, гликозаминогликана (као што је хијалуронска киселина) и протеогликана. Учествују у процесу зарастања код различитих оштећења гингиве (механичког, хемијског и сл.), активирајући се и мигрирајући на место оштећења или запаљења. Могу се диференцирати у миофибробласте, који имају особине фибробласта и глатких мишићних ћелија, а помажу у зарастању рана (контракција ткива) (94). Важно је напоменути да, захваљујући лучењу цитокина, хемокина (као што је интерлеукин 6) учествују у регулацији имунског одговора. Такође, у случају дисбиозе, може доћи до испољавања овог имуномодулаторног својства и појачавања запаљенског одговора (95, 96). У почетку активација гингивалних фибробласта учествује у елиминацији патогених бактерија и смањењу запаљења. Међутим, неконтролисана активација ових ћелија доводи до супротног ефекта, тј. промоције даљег запаљења које води ка разарању дубљих ткива пародонцијума. У инфламираном ткиву гингиве, фибробласти испољавају проинфламаторни фенотип који стимулише остеокласте и појачава хронично запаљење. На тај начин доприносе постојећој дисбиози у етиопатогенези пародонтитиса. Овај аспект физиологије и патофизиологије фибробласта је тема многих истраживања (97, 98).

До сада је испитиван утицај различитих стоматолошких материјала на ћелије оралне слузнице. Испитивани су различити материјали за директне и индиректне испуне, материјали за цементирање привремених и трајних протетских надокнада, материјали за отиске (99-101). Такође, примена различитих имплантата је тема истраживача који су, између осталог, пратили и понашање ћелија оралне мукозе и коштаног ткива (102, 103). Анализом података из литературе

може се закључити да на фибробласте неповољно утичу ниске рН вредности, присуство резидуалних мономера, нагле промене температуре при везивању неких материјала, продужени контакт са јаким киселинама или базама, метални јони у високим концентрацијама.

Будући да се различита средства за реминерализацију глеђи, као и нисковискозне композитне смоле апликују на површину зуба и да су у директном контакту са оралним ткивима, како меким, тако и чврстим, потребно је потврдити и њихову биокомпатибилност. Приликом употребе већина ових средстава може доћи у контакт са оралним ткивима укључујући гингиву. Тако да, последично, може доћи до појаве запаљења, алергијских реакција или испољавања цитотоксичног дејства (41, 43, 99, 104). Лакови са флуоридима ослобађају јоне флуора, док *CPP-ACP* пасте јоне калцијума и фосфата. Када се ови материјали апликују на површину зуба, гингива долази у непосредни контакт са самим материјалом, као и са ослобођеним јонима. Почетне каријесне лезије глеђи су често локализоване у гингивалној трећини крунице зуба, као и на апроксималним површинама зуба, апикално од контактне тачке. Наведене зоне представљају каријес предилекциона места и у блиском су односу са маргиналном гингивом и интерденталном папилом. Приликом инфилтрације белих лезија композитном смолом неопходно је обезбедити апсолутно суво радно поље употребом кофердам гуме. На овај начин, постиже се и заштита меких ткива усне дупље од дејства различитих средстава који се користе током процедуре инфилтрације. Сматра се да код примене композитних смола, услед непотпуне полимеризације или деградације, може доћи до накнадног ослобађања компоненти које могу утицати на ткива која окружују зуб (99, 105). Стога, неопходно је да наведена средства буду у биолошком складу са оралном слузницом (106). Постоји потреба за даљим истраживањем утицаја препарата са флуоридима и средстава са *CPP-ACP* на оралну мукозу, будући да су доступне студије дале различите резултате у зависности од концентрације активних јона (107). Према нашим сазнањима, у научној литератури још увек нема доступних података о утицају инфилтрационе смоле на ћелије хумане гингиве.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Основни и ближи циљеви истраживања

Основни циљ овог *in vitro* истраживања је био утврдити успешност примене различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи и њихов утицај на одређене микроорганизме и ћелије гингиве.

Анализом проблема истраживања постављени су следећи **ближи циљеви**:

1. Испитати успешност примене три различита раствора за деминерализацију са различитим временима излагања и проценити карактеристике насталих почетних каријесних лезија глеђи помоћу скенинг електронског микроскопа и на основу добијених резултата одабрати одговарајући раствор за формирање почетних каријесних лезија глеђи;

2. Утврдити морфолошке промене глеђи након различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола) методом скенинг електронске микроскопије;

3. Испитати утицај различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола) на вредности микротврдоће глеђи;

4. Испитати утицај различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола) на формирање биофилма (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*);

5. Испитати утицај средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола) на вијабилност и адхезију фибробласта хумане гингиве.

2.2. Радне хипотезе истраживања

1. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем вредности микротврдоће глеђи:

Испитивани третмани почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола) статистички значајно утичу на повећање микротврдоће глеђи у односу на вредности микротврдоће глеђи почетне каријесне лезије.

2. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем формирања биофилма:

Постоји статистички значајна разлика у пријемчивости бактерије *Streptococcus mutans* и гљивице *Candida albicans* за интактну глеђ, површину глеђи почетних каријесних лезија и површину белих мрља након различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола).

3. Радна хипотеза истраживања у вези са испитивањем утицаја на хумане фибробласте гингиве:

Различити третмани почетне каријесне лезије глеђи (лак са флуоридима, паста са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом и нисковискозна инфилтрациона смола) значајно утичу на смањење вијабилности хуманих фибробласта гингиве.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Стоматолошког факултета Универзитета у Београду (Одобрење бр. 36/11). Одрађено је на Клиници за дечју и превентивну стоматологију, Клиници за оралну хирургију, Лабораторији за биохемију, Имплантолошко-истраживачком центру (Микробиолошка лабораторија, Лабораторија за културу ћелија) Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду и Пољопривредном факултету Универзитета у Београду.

У истраживању су коришћени премолари екстраховани пацијентима узраста 12-18 година на Клиници за дечју и превентивну стоматологију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Родитељи/старатељи деце су обавештени о природи и циљевима истраживања и тражена је њихова писана сагласност за употребу зуба, без могућности генетичке анализе (Прилог 1). У делу истраживања су коришћени хумани фибробласти добијени из узорака гингиве (величине 3x3x3 mm) током хируршке екстракције трећих сталних молара на Клиници за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. У овом делу истраживања укључено је 6 системски здравих пацијената узраста 18-22 године који су претходно обавештени о истраживању и који су потписали информисани пристанак за учешће у истом (Прилог 2).

Критеријуми за селекцију зуба (премолара) за истраживање су били: интактни први и други, горњи и доњи премолари чија је екстракција индикована због планиране ортодонтске терапије.

Критеријуми за искључење зуба (премолара) из истраживања: постојање изражених морфолошких варијација, кредастих или тамних замућења, хипопластичних промена, хипоминерализованих промена или трауматских дефеката.

3.1. Избор раствора за формирање артифицијелних белих мрља - Пилот студија

3.1.1. Испитивани раствори

In vitro пилот студија је спроведена у циљу одабира одговарајућег раствора за деминерализацију и формирање артифицијелних почетних каријесних лезија глеђи (белих мрља). Ово истраживање спроведено је на Клиници за дечју и превентивну стоматологију и у Лабораторији за биохемију (ОЈ Институтски предмети) Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, а скенинг електронска микроскопија (СЕМ) је извршена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

Искоришћено је 20 премолара хуманог порекла који су прикупљени према претходно описаном протоколу. Након детаљног уклањања остатака ткива, потопљени су у 0,1% раствор тимола, на собној температури, до почетка експеримента. Методом случајног избора разврстани су у четири групе: једну контролну групу (Група 1: интактна глеђ, узорци потопљени у физиолошки раствор) и три тест групе (Групе 2, 3 и 4), у зависности од употребљеног раствора за деминерализацију, вредности рН и времена у току којег су били изложени дејству раствора. Раствор у Групи 2 као главне компоненте је садржао сирћетну киселину и монокалијум фосфат (108-110), а у Групи 3 и 4 млечну киселину и монокалијум фосфат, различитих концентрација (111, 112). Све особине наведених раствора за деминерализацију приказане су у Табели 3.

Табела 3. Особине раствора за деминерализацију и времена излагања.

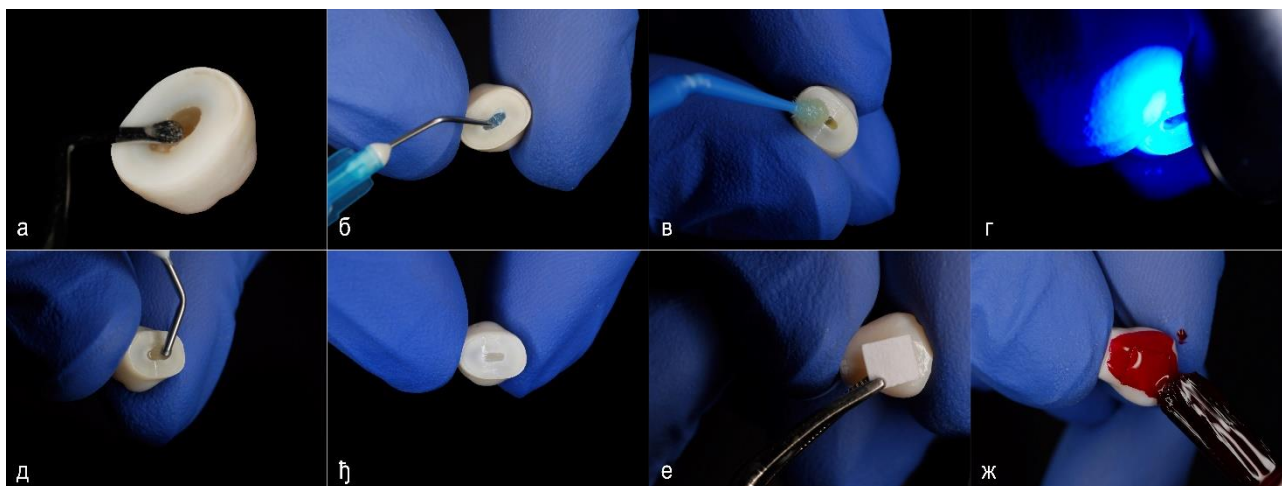
	Група 2	Група 3	Група 4
Састав	2,2 mmol/L Калцијум хлорид	12 mmol/L Калцијум хлорид	18 mmol/L Калцијум хлорид
	2,2 mmol/L Монокалијум фосфат	10 mmol/L Монокалијум фосфат	7,8 mmol/L Монокалијум фосфат
	0,05 mmol/L Сирћетна киселина	50 mmol/L Млечна киселина	100 mmol/L Млечна киселина
	/	100 mmol/L Натријум хлорид	3 mmol/L Натријум азид
	рН	4,4	4,5
Трајање	4 дана/96 сати	5 дана/120 сати	21 дан/ 504 сата

3.1.2. Припрема узорака

Коренови зуба (премолара) су уклоњени сечењем дијамантским диском мале брзине у апарату Isomet (Buehler Ltd, Лејк Блаф, Илиноис, САД), уз водено хлађење, у нивоу глејно – цементне границе (Слика 2). Садржај круничне коморе пулпе уклоњен је екскаватором, а комора пулпе попуњена течним композитом (Revolution Flowable Composite, Kerr, САД) – Слика 3.

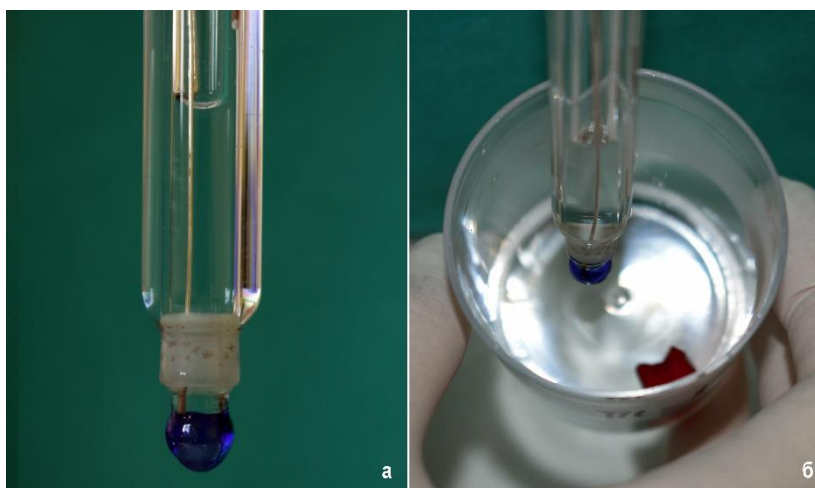


Слика 2. Одсецање круница премолара у нивоу глејно-цементне границе.



Слика 3. Поступак припреме крунице зуба: а) уклањање пулног ткива; б) третирање ортофосфорном киселином; в) наношење адхезива; г) полимеризација; д) попуњавање пулне коморе течним композитом; њ) изглед након полимеризације; е) одређивање величине прозора на вестибуларној површини (4 x 4 mm); ж) наношење лака на круницу зуба.

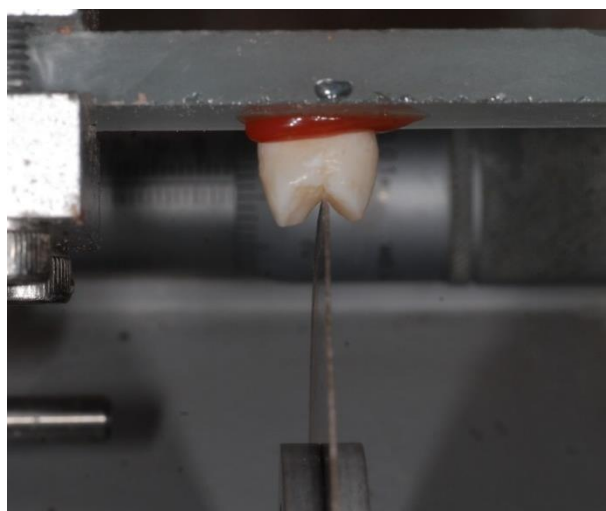
На букалним и оралним површинама круница премолара, формиран је прозор величине 4 x 4 mm, лепљењем адхезивне траке поменуте величине (Слика 3). Након тога, крунице су прелакиране танким слојем лака резистентним на дејство киселина (Essence, Cosnova GmbH, Сулзбах, Немачка). Након сушења лака, адхезивне траке су уклоњене. На овај начин, свака круница премолара имала је 2 прозора која су била изложена дејству деминерализационог раствора. Свака круница премолара је била потопљена у 20 ml раствора за деминерализацију, у стерилну пластичну бочицу. Свакодневно се вршила провера рН вредности (Mi 150, рН/Temperature Bench Meter, Martini instruments, Северна Каролина, САД) и помоћу калијум-хидроксида (KOH) одржавала на иницијално одређеној вредности (Слика 4). Узорци су складиштени на собној температури, сходно препорукама из литературе (109, 110).



Слика 4. Свакодневно је вршена провера рН вредности.

3.1.3. Скенинг електронска микроскопија

Након истека деминерализационог периода, остаци лака за нокте су уклоњени ацетоном без уља, а потом крунице зуба испране дестилованом водом. Након тога, крунице премолара су пресечене на вестибуларну и оралну половину помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату Isomet, уз водено хлађење (Слика 5). Из централног дела сваке половине круница зуба исечена је плочица дебљине 1 mm, у вестибуло-оралном правцу. Сви узорци су полирани карбидним папиром растуће финоће (600, 800, 1000, 1200), уз водено хлађење. Испрани су дестилованом водом, осушени и третирани 37% ортофосфорном киселином (Gel Etchant, Kerr, САД) током 30 секунди. Након обилног испирања и сушења, узорци су дехидрирани у серији растућих алкохолних разблажења (25%, 50%, 70%, 90%, 95%). Осушени су ваздухом без уља и воде. Узорци су постављени на металне држаче, напарени златом (Bal-Tec SCD 005 Sputter Coater, Балзерс, Лихтенштајн) – Слика 6. Посматрани су на скенинг електронском микроскопу (JEOL-JSM-6460LV, Токио, Јапан) под различитим увећањима (40, 100, 700, 1000).



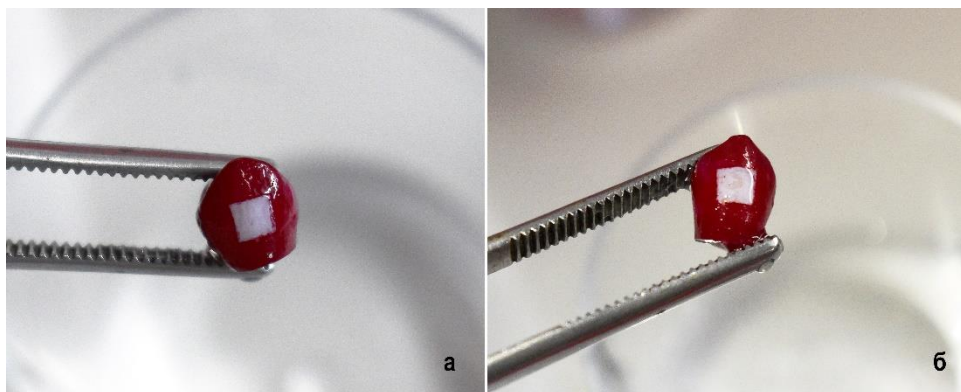
Слика 5. Пресецање крунице премолара на вестибуларну и оралну половину.



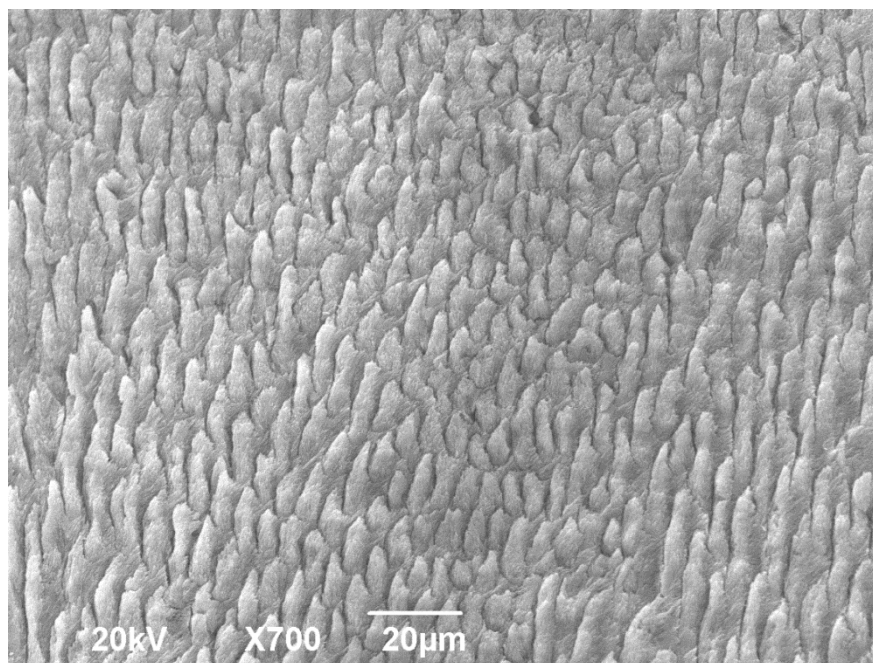
Слика 6. Узорци напарени златом и постављени на металне држаче.

3.1.4. Резултати пилот студије

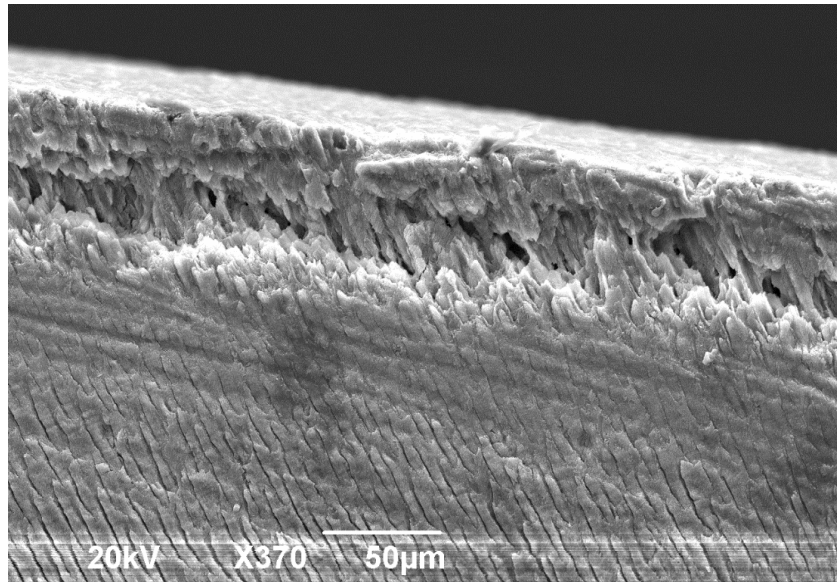
У тест групама 2 и 3, прозори на зубима који су били изложени раствору за деминерализацију, на собној светлости, показивали су макроскопске промене у виду беличasto-опакних мрља (Слика 7). СЕМ испитивање показало је да је у групама 2 и 3 дошло до формирања почетних каријесних лезија глеђи, које су се разликовале од изгледа интактне глеђи у групи 1 (Слике 8, 9, 10). У групи 2 просечна дубина је износила $48,55 \mu\text{m}$ ($\pm 1,11$), а у групи 3 је била нешто нижа вредност $43,23 \mu\text{m}$ ($\pm 6,74$). У групи 4 није очуван структурни интегритет глеђи, на СЕМ микрографијама су се могле уочити површинске ерозије глеђи, са разарањем глеђних призми (Слика 11).



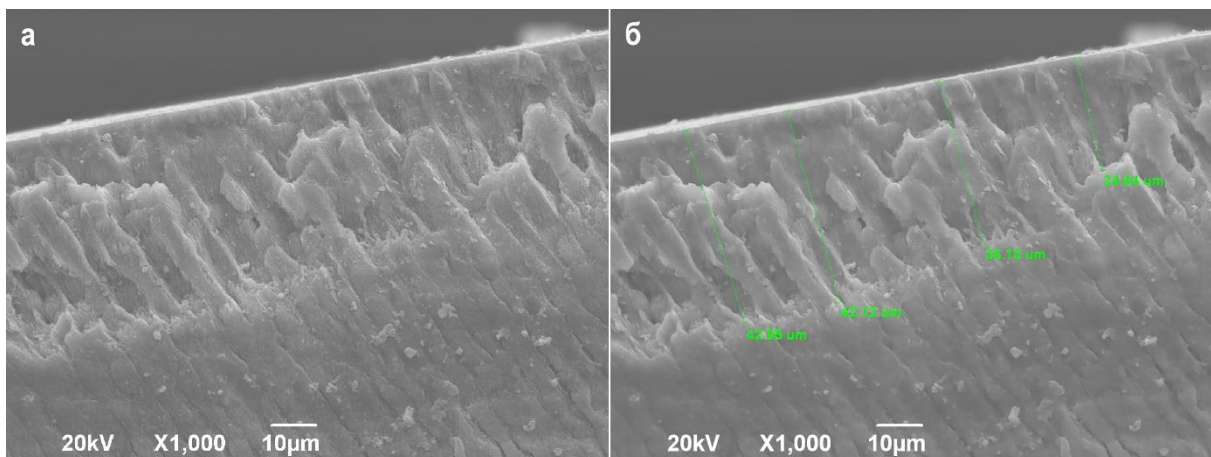
Слика 7. Беличasto-опакни изглед прозора који су били изложени дејству раствора за деминерализацију у групи 2 и 3.



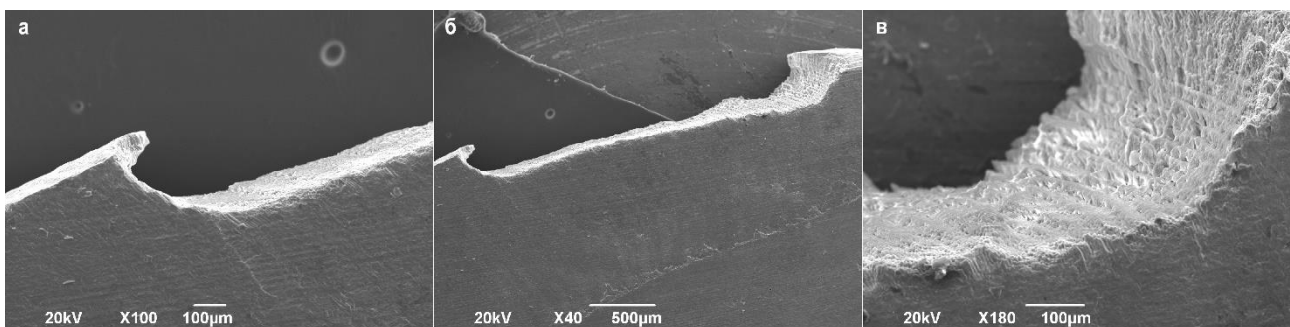
Слика 8. Изглед здраве глеђи на СЕМ-у (група 1), може се уочити правилан распоред глеђних призми.



Слика 9. Скенинг електронска микроскопија узорака у Групи 2: Уочава се формирање почетне каријесне лезије глеђи, са потповршинском зоном деминерализације глеђи и проширеним интерпризматским просторима.



Слика 10. Скенинг електронска микроскопија узорака у Групи 3: Уочава се формирање потповршинске зоне деминерализације са проширеним интерпризматским просторима.



Слика 11. Скенинг електронска микроскопија узорака у Групи 4: Присутан кавитет у глеђи, уочава се разарање структуре глеђних призми.

3.1.5. Избор раствора за формирање артифицијелних белих мрља

На основу добијених резултата, може се закључити да су раствори за деминерализацију употребљени у другој и трећој групи дали почетне каријесне лезије глеђи сличних особина, док је исход раствора у четвртој групи био настанак дефеката глеђи. У другој групи је остварена нешто већа дубина почетних каријесних лезија, па је у наставку истраживања коришћен раствор састављен од калцијум хлорида, монокалијум фосфата и сирћетне киселине одговарајућих концентрација, са рН вредношћу 4,4 и дужином излагања раствору од 96 сати.

3.2. Расподела узорака

Даље истраживање је обухватило четири засебна дела:

I – Испитивање морфолошких промена глеђи након различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи методом скенинг електронске микроскопије (СЕМ);

II – Испитивање микротврдоће глеђи;

III – Испитивање пријемчивости за формирање биофилма (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*);

IV – Испитивање утицаја на ћелије хумане гингиве (фибробласте).

У свакој од наведених целина, зуби су разврстани у пет група методом случајног узорка:

Група А – Зуби са интактном површином глеђи;

Група Б – Зуби са артифицијелном почетном каријесном лезијом глеђи (белом мрљом);

Група Ц – Зуби са третираном артифицијелном почетном каријесном лезијом глеђи висококонтрованим лаком са флуоридима;

Група Д – Зуби са третираном артифицијелном почетном каријесном лезијом глеђи пастом са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом;

Група Е – Зуби са третираном артифицијелном почетном каријесном лезијом глеђи нисковискозном композитном смолом.

3.3. Протокол третмана почетних каријесних лезија глеђи

3.3.1. Примена висококонтрованог лака са флуором (*Fluor Protector S*, *Ivoclar Vivadent*, *Шан*, *Лихтенштајн*) – група Ц

Концентрација флуорида у хомогеном лаку износи 7,700 ppm, а након примене и сушења на зубима повећава се четири пута. Иницијалне каријесне лезије глеђи су третиране према упутству произвођача: након сушења површине зуба, бела мрља је премазана лаком, у танком слоју помоћу

четкице (Vivabrush G, Ivoclar Vivadent, Шан, Лихтенштајн). Предвиђено време сушења лака, према препоруци произвођача, износи 60 секунди. Након тога, сваки узорак је потопљен у дејонизовану воду, у стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Узорци су били потопљени током 28 дана.

3.3.2. Примена пасте са аморфним калцијум фосфатом казеин фосфопептидом (*Tooth Mousse*, GC, Токио, Јапан) – група Д

Након сушења, инцијалне каријесне лезије глеђи су премазане пастом *Tooth Mousse* (GC, Токио, Јапан) у трајању од 5 минута. Вишак пасте је уклоњен ватеролном. Сваки узорак је потопљен у дејонизовану воду, у стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Процедура реминерализације се понављала током 28 дана, једном дневно.

Табела 4. Протокол за примену нисковискозне смоле. *

Клинички поступци	Препоруке
Корак 1: <i>Icon-etch</i>	Нанети киселину помоћу наставка; Оставити да делује 2 минута, уз периодично утрљавање киселине; Испирати водом 30 секунди; Посушити лезију.
Корак 2: <i>Icon-dry</i>	Нанети алкохол помоћу одговарајућег наставка; Оставити да делује 2 минута; Посушити.
Корак 3: <i>Icon-infiltrant</i>	Нанети смолу одговарајућим наставком на лезију; Оставити да се инфилтрира током 2 минута уз периодично додавање смоле; Уклонити вишак материјала ватеролном; Полимеризација 40 секунди; Поновити наношење смоле током 1 минута, као што је претходно описано; Полирање

* Подаци преузети из документације произвођача.

3.3.3. Примена нисковискозне инфилтрационе смоле (ICON, DMG, Хамбург, Немачка) – група Е

Извршено је нагризање површине беле мрље киселином - 15% HCl (*Icon Etch gel*) у трајању од 2 минута, уз периодично утрљавање гела. Након тога, гел је детаљно испран водом (30 секунди) и лезија је посушена ваздушним млазом без уља. Следила је примена етанола (*Icon Dry*), 30 секунди, и сушење млазом ваздуха без уља и воде. Помоћу микрочеткице вршено је утрљавање инфилтрационе смоле (*Icon Infiltrant*) у трајању од 3 минута. Након истека предвиђеног

временског периода, вишак материјала је уклоњен ватеролном, а нанета смола просветљена VAFU лампом за полимеризацију (VRN Products), модом 1600mW/cm². Апликација инфилтрата је поновљена још једном у трајању од 1 минут, након чега је следио исти поступак уклањања вишка материјала и полимеризације (поступак описан у Табели 4). Сваки узорак је потопљен у дејонизовану воду, у стерилну пластичну бочицу, на собној температури. Узорци су били потопљени током 28 дана.

Табела 5. Састав и произвођач материјала који су коришћени у истраживању. *

Материјал	Састав	Произвођач
Fluor Protector S	1,5% амонијум-флуорид (7,700 ppmF) Етанол Вода Сахарин Полимер Адитиви	<i>Ivoclar Vivadent</i> , Шан, Лихтенштајн
Tooth Mousse	казеин фосфопептид- аморфни калцијум фосфат, вода, глицерол, пропилен гликол, D-сорбитол, натријум-карбоксил-метил- целулоза, силицијум- диоксид, титанијум- диоксид, ксилитол, гуар гума, фосфорна киселина, натријум сахарин, цинк- оксид, магнезијум-оксид, етил-4-хидроксибензоат, пропил-4-хидроксибензоат, бутил-4-хидроксибензоат	GC, Токио, Јапан
ICON	<u>Icon-Etch:</u> Хлороводонична киселина (15% HCl), Пиросилицијумова киселина, површински активне супстанце <u>Icon-Dry:</u> 99% раствор етанола <u>Icon-Infiltrant:</u> Нисковискозне смоле – триетилен гликол диметакрилат, иницијатори, адитиви	<i>DMG</i> , Хамбург, Немачка

* Подаци преузети из техничке документације произвођача.

Узорци у групама А и Б су били потопљени у дејонизовану воду, на собној температури до почетка наредних фаза истраживања.

Карактеристике материјала који су употребљени у истраживању приказане су у табели 5.

3.4. Испитивање морфолошких промена глеђи након различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи методом скенинг електронске микроскопије (СЕМ)

Скенинг електронска микроскопија је одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

Након завршеног третмана почетне каријесне лезије глеђи према претходно описаној процедури, узорци су припремљени за скенинг електрон микроскопију. Како би се омогућило исецање узорака на одговарајући начин, узорци су фиксирани лепљивим воском (Галео, Галеника, Србија) за стаклену плочицу. Свака половина крунице премолара је сечена у буко-оралном смеру, како би се добио узорак за микроскопију дебљине 1 mm, помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Тако формирану узорци (плочице) су полирани силикон карбидним папиром растуће финоће зрна (600, 800, 1000, 1200) под воденим хлађењем. Након обилног испирања дестилованом водом, узорци су третирали 37% ортофосфорном киселином у трајању од 30 секунди (*Gel Etchant*, Kerr), након чега су детаљно испрани дестилованом водом. Након сушења ваздушним млазом без уља, узорци су дехидрирани у серији алкохолних раствора (25%, 50%, 70%, 90%, 95%). Поново су осушени ваздушним млазом без уља. Пре СЕМ анализе (*JEOL-JSM-6460LV*, Токио, Јапан), све плочице напарене су златом (*Bal-Tec SCD 005 Sputter Coater*, Балзерс, Лихтенштајн), а затим су постављене у апарат и посматране под различитим увеличањима (40, 700, 1000, 1500, 4000).

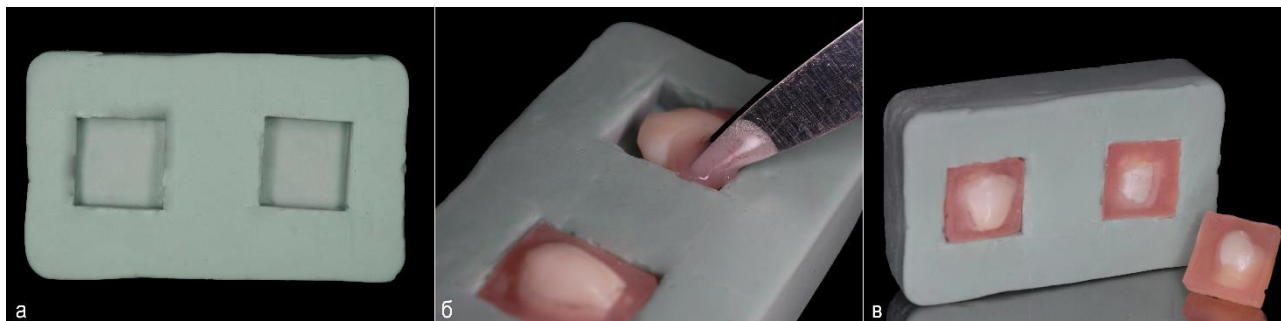
Посматрана је дубина почетних каријесних лезија глеђи као и дубина пенетрације материјала. Такође, описане су уочене промене у структури глеђи и вршено је њихово упоређивање са изгледом интактне глеђи. Посматрана је и површина интактне глеђи, површина беле мрље као и беле мрље третиране испитиваним препаратима.

3.5. Испитивање микротврдоће глеђи

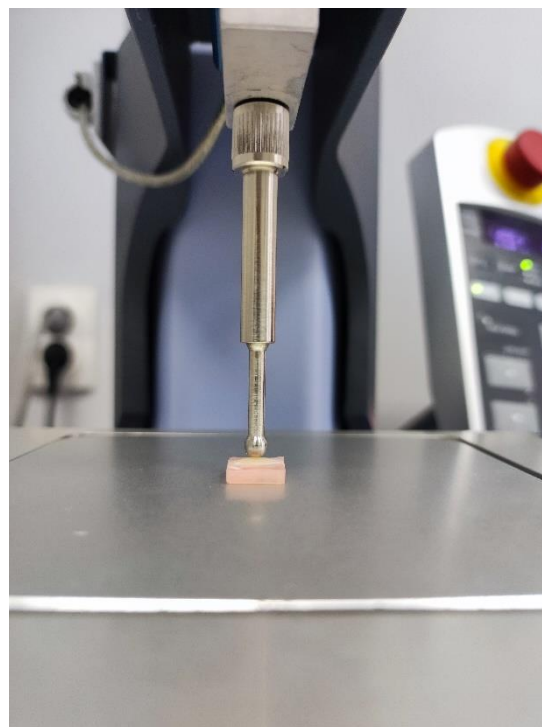
Испитивање микротврдоће је спроведено на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду *Oliver Pharr* методом и употребом мерача (сонде) сферног облика (*Shimadzu Indenter*, Кјото, Јапан). У свакој групи (А, Б, Ц, Д, Е), број узорака је био 15 (n=15). Укупан број узорака је износио 75.

Након спроведеног процеса деминерализације и одговарајућег третмана почетних каријесних лезија глеђи, извршено је припремање узорака за мерење микротврдоће. Направљени

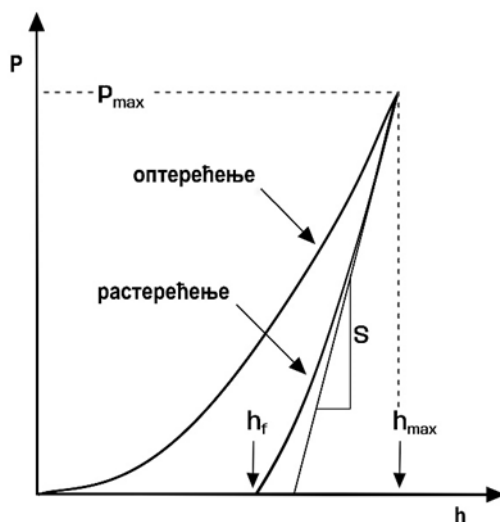
су калуи одговарајуће величине (1cm x 1cm) у силикону (Zetaplus, Zhermack, Бадија Полезине, Италија). У њима, узорци су фиксирани у самовезујућем акрилату (Fuji Tempcon, GC, Токио, Јапан) при чему је површина глеђи била експонирана и доступна сонди мерача (Слика 12). При томе, површина глеђи зуба је фиксирана што паралелније подлози (Слика 13).



Слика 12. Узорци фиксирани у самовезујућем акрилату, при чему је површина глеђи, која ће бити изложена сонди мерача, постављена што паралелније подлози.



Слика 13. Изглед апарата и процес мерења микротврдоће: сонда мерача усмерена на површину глеђи зуба.



Слика 14. Крива оптерећења и растерећења током мерења микротврдоће (преузето и прилагођено из: Oliver WC, Pharr GM. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. Journal of Materials Research. 2004;19:3–20. doi:10.1557/jmr.2004.19.1.3.)

Код *Oliver Pharr* методе, односно аналитичког система мерења тврдоће глеђи, бележи се комплетна крива оптерећења и растерећења (Слика 14), а затим анализира део криве током растерећења како би се израчунала вредност тврдоће према следећој формули:

$$H = P_{\max}/A$$

У наведеној формули:

H – тврдоћа

P_{max} – максимална сила оптерећења (енгл. *Peak Load*)

A – ефективна контактна површина између индентера и испитиване површине при максималној сили оптерећења.

Варијабла **A** се рачуна помоћу формуле:

$A = 24,5 \cdot h_c^2$ (h_c представља дубину контакта, а добија се помоћу формуле: $h_c = h_{\max} - \epsilon \cdot P_{\max}/S$; при чему h_{\max} представља максималну дубину пенетрације, ϵ је константа која зависи од врсте индентера, а S означава нагиб криве растерећења на почетку).

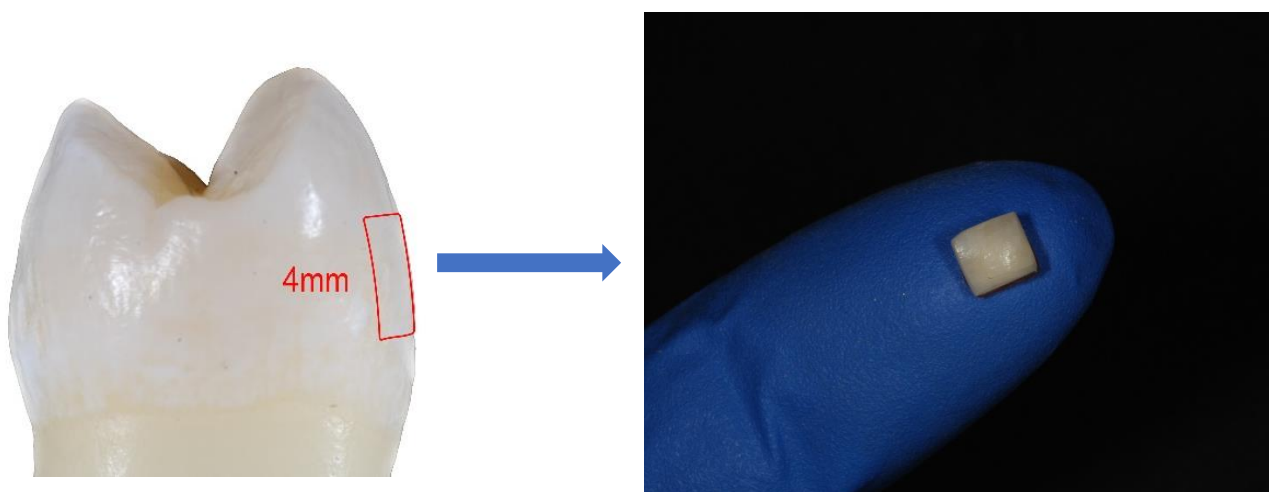
Вршена су 3 мерења у централном делу формираног прозора на површини глеђи сваког узорка (Слика 13), након чега су према претходно наведеном математичком моделу израчунате

вредности тврдоће глеђи (MPa). На крају, израчуната је средња вредност микротврдоће за сваки узорак.

3.6. Испитивање пријемчивости површине глеђи за формирање биофилма

Испитивање је извршено у Лабораторији за микробиологију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

У овом делу истраживања вршено је исецање глеђних модела из крунице премолара, површине 4x4 mm и дебљине 2 mm (Слика 15). Исецање је вршено помоћу апарата *Isomet* (Buehler Ltd, Лејк Блаф, Илиноис, САД), уз водено хлађење.



Слика 15. Глеђни модели, исечени из крунице премолара.

Употребљено је 5 узорака (глеђних модела) по групи за сваки испитивани микроорганизам ($n=5$). Један узорак из сваке групе је искоришћен за СЕМ анализу, а преостали за микробиолошко испитивање (бројањем формираних колонија по милилитру узорка - *CFU/ml*). Укупан број узорака је износио 50.

Након завршеног процеса деминерализације и формирања белих мрља, из сваке половине крунице зуба извршено је исецање глеђног модела величине 4 x 4 mm и дебљине 2 mm помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Интактне половине круница премолара у групи А су на исти начин пресечене, како би се добили глеђни модели одговарајуће величине.

Овако добијени глеђни модели стерилисани су у аутоклаву (121° C, 15 мин). Узорци у групама А и Б су складиштени у дејонизованој води, а узорци у групама Ц, Д, Е су третирани у ламинару (Airstream Class II BSC, Esco, САД), према претходно описаном протоколу.

3.6.1. Квантификација формираног мономикробног биофилма бројањем колонија по милилитру узорка (енгл. *Colony Forming Units – CFU/ml*)

3.6.1.1. Референтни сојеви бактерија и услови раста

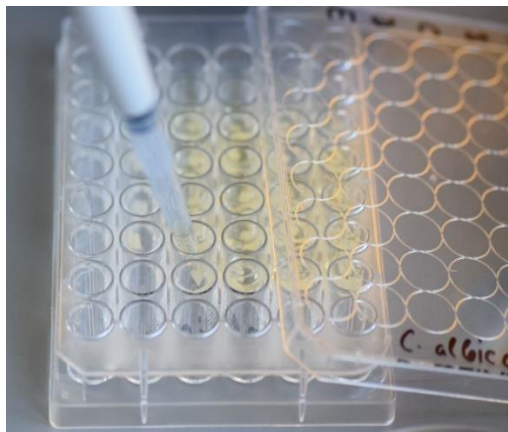
Испитивана је пријемчивост за формирање мономикробног биофилма следећих референтних сојева микроорганизама: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) и *Candida albicans* (ATCC 10231) (Microbiologics KWIK-STIK, Манасас, ВА, САД). Микроорганизми су активирани засејавањем у одговарајући бујон и агар: *S. mutans* у Мождано срчаном инфузионом (енгл. *Brain Heart Infusion – BHI*) бујону (HiMedia, Мумбај, Индија) и TYCSB (Tryptone Yeast Extract Cystine w/ Sucrose and w/o Bacitracin Agar) агар (HiMedia, Мумбај, Индија); *C. albicans* у RPMI 1640 медијуму (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma-Aldrich, Ст. Луис, МО, САД) и Сабуро декстрозном агару (HiMedia, Мумбај, Индија). Инкубирани су на 37° С у трајању 48 сати у аеробним (*C. albicans*) односно анаеробним условима (*S. mutans*), што је наведено у Табели 6. Након активације референтних сојева микроорганизама, неколико колонија бактерије и гљивице пренето је у одговарајуће бујоне и инкубирани су 3 сата. Добијена суспензија бактерије/гљивице центрифугирана је на 3.000 обртаја у минути током 10 минута (Ласе 6, Colo Lab Experts, Љубљана, Словенија). Након тога, супернатант је одстрањен, а талог ресуспендован у стерилном фосфатном пуферском раствору и подешен на замућење од 0,5 *McFarland* стандарда (eng. *DEN-1 densitometar*, Biosan, Рига, Летонија) што одговара 10^8 бактеријских ћелија у милилитру и 10^5 гљивица у милилитру. Бактеријска суспензија је серијски разређивана одговарајућим медијумом како би се постигла коначна концентрација од 10^5 ћелија у милилитру.

Табела 6. Основне карактеристике микроорганизама и услова раста.

Микроорганизам	Референтни сој	Хранљива подлога	Услови раста
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	<i>Mutans Sanguinis</i> агар	Анаеробни
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	<i>Saburo</i> декстрозни агар	Аеробни

3.6.1.2. Формирање биофилма

Након спровођења свих протокола терапије иницијалне каријесне лезије глеђи и провере стерилности узорака, приступило се формирању мономикробних биофилмова. Узорци, тј. глеђни модели, пажљиво су постављени у две микротитрационе плоче (96 поља), једна је служила за испитивање *S. Mutans*, а друга за *C. albicans*. Сви постављени узорци су прекривени са 100µl стерилне вештачке пљувачке (Апотекарска установа Београд, Београд, Србија) у трајању од 4 часа како би се формирала примарна зубна пеликла. Након тога, вештачка пљувачка је одстрањена и 200µl суспензије бактерије/гљивице, чије је припремање детаљно објашњено у претходном одељку, уливано је у сваки бунарић микротитрационе плоче. Даља инкубација вршена је на 37° С у трајању 48 сати у аеробним (*C. albicans*) односно анаеробним условима (*S. mutans*).



Слика 16. Глеђни модели су посатвљени у микротитрационе плоче (са 96 поља). Приказано је додавање 200 μ л суспензије бактерије/гљивице.

3.6.1.3. Квантификација биофилма (енгл. *CFU/ml*)

Након периода инкубације, вршила се квантификација биофилма. Узорци су испрани стерилним фосфатним пуферским раствором у циљу елиминације неатхерираних бактеријских ћелија. Сваки узорак глеђи са формираним биофилмом пренет је у стерилну пластичну тубицу са по 1 милилитром стерилног физиолошког раствора, вортексован 5 минута на 900 обртаја обртаја на 37°C (LLG Unitermix 1 pro, Lab Logistics Group GmbH (LLG), Am Hambuch 1, 53340 Мекенхајм, Немачка) у циљу скидања биофилма са узорка у сам раствор. По 20 μ л овог раствора и још осам десеторструких разблажења засејавано је на одговарајуће чврсте хранљиве подлоге - *Mutans Sanguinis* агар (*HiMedia*, Мумбај, Индија) за *S. mutans* и *Saburo* декстрозни агар (*HiMedia*, Мумбај, Индија) за *C. albicans* (Табела 6). Засејане плоче су инкубиране у истим условима као и плоче за формирање биофилмова. Након овог периода приступило се квантификацији бројањем (*Colony Forming Units - CFU*) по милилитру узорка (*CFU/ml*).

3.6.1.4. Анализа формираног мономикробног биофилма скенинг електрон микроскопијом (SEM)

Узорци за SEM су фиксиран у 2,5% глутаралдехиду током 24 сата. Након тога припремљени су за посматрање уз дехидратацију узорака у одговарајућим концентрацијама алкохола и сирћетне киселине: 3% сирћетна киселина, 15 минута; 3% сирћетна киселина и 25% етанол, однос 1:1, 15 минута; 3% сирћетна киселина и 50% етанол, 15 минута, 70% етанол, остављени у њему до SEM анализе. Пре SEM анализе (JEOL-JSM-6460LV, Токио, Јапан), сви узорци су остављени да се осуше током 24 часа, а затим су напарени златом (Val-Tec SCD 005 Sputter Coater, Балзерс, Лихтенштајн), постављени у апарат и посматрани под различитим увећањима (700, 2000). Коришћењем скенинг електронске микроскопије се визуелизовало формирање мономикробног биофилма у свим испитиваним групама (један узорак из сваке групе). SEM анализа је одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

3.6.2. Квантификација микроорганизама методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену

Суспензије микроорганизама добијене са глеђних модела са формираним биофилмом (поступак описан у поглављу 3.6.1.3) су коришћене и за изолацију ДНК молекула методом прокувавања (113). Иста метода изолације ДНК примењена је и на десетострука разблажења суспензија референтних сојева *Streptococcus mutans* (АТСС 25175) и *Candida albicans* (АТСС 10231) (Microbiologics KWIK-STIK, Манасас, ВА, САД) намењених за конструкцију стандардне криве (концентрације разблажења од 10^8 CFU/mL до 10^4 CFU/ml). По 50 μ l суспензије из сваког узорка и референтног соја је пребачено у стерилне пластичне тубе запремине 1,5 ml, а затим је у њих додато и по 300 μ l 50 mM раствора NaOH. Ова смеша је затим загревана у термоблоку (Thermo-Shaker TS-100C®, Biosan, Рига, Летонија) на 95 °C у трајању од 5 минута, а по истеку тог времена у њу је, за потребе стабилизације ДНК молекула, додато 30 μ l 1M раствора Tris-HCl (трис-(хидроксиметил)-аминометан хидрохлорид), pH 8. Узорци су затим центрифугирани на $12100 \times g$ (MiniSpin, Eppendorf, Хамбург, Немачка) у трајању од 2 минута. Коначно, супернатант је пребачен у нове, стерилне тубе и до анализа чуван на -20 °C.

За потребе квантификације испитиваних микроорганизама коришћена је метода ланчане реакције полимеразе у реалном времену са *TaqMan* пробама (енгл. *TaqMan real-time polymerase chain reaction*, *TaqMan real-time PCR*; Табела 7). Реакциона смеша се састојала од 9,25 μ l стерилне воде без нуклеаза, 3 μ l мастер микса (HOT FIREPol, Probe Universal qPCR Mix, Solis Biodyne, Тарту, Естонија), 0,75 μ l есеја за *TaqMan real-time PCR* (IDT, Integrative DNA Technologies, Коралвил, Ајова, САД; секвенце проба и прајмера су приказане у табели 7) и 2 μ l узорка ДНК. Умножавање ДНК је вршено у дупликату на *real-time PCR* апарату (QuantStudio™ 1 Real-Time PCR System, Питсбург, САД) (Слика 17) према следећим условима реакције: иницијална денатурација на 95 °C у трајању од 10 минута, 40 циклуса денатурације (95 °C, 30 секунди), хибридизације (60 °C, 30 секунди) и елонгације (72 °C, 30 секунди) и завршна елонгација на 72 °C у трајању од 5 минута. Изолација ДНК и њено умножавање спроведено је у Лабораторији за базична истраживања Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

Табела 7. Прајмери и пробе за *TaqMan real-time PCR*.

Микроорганизам	Секвенце прајмера и проба (5' - 3')
<i>Streptococcus mutans</i>	Водећи – TGGGACGCAAGGGAACA
	Реверзни – CCCGTTGCGACTCAAGA
	Проба – 56-FAM-CTTGCACACCGTGTTT-36-TAMSp
<i>Candida albicans</i>	Водећи – GGGTTTGCTTGAAAGACGGTA
	Реверзни – TTGAAGATATACGTGGTGGACGTTA
	Проба – ACCTAAGCCATTGTCAAAGCGATCCCG-36TAMSp



Слика 17. *QuantStudio™ 1 Real-Time PCR* апарат.

3.7. Испитивање утицаја различитих третмана глеђи на ћелије хумане гингиве

Овај део истраживања је обављен у Имплантолошком истраживачком центру Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

Коришћено је 5 узорака по групи ($n=5$). Процена ћелијске вијабилности се вршила у трипликату. Преостала два узорка у свакој групи су искоришћена за СЕМ анализу. Укупан број узорака је био 25.

Након завршеног процеса деминерализације, из сваке половине крунице зуба извршено је исецање глеђног модела величине 4 x 4 mm и дебљине 2 mm помоћу дијамантског диска мале брзине у апарату *Isomet*, уз водено хлађење. Интактне половине круница премолара у групи А су на исти начин пресечене, како би се добили глеђни модели одговарајуће величине.

Овако добијени глеђни модели су стерилисани у аутоклаву (121 °C, 15 мин). Узорци у групама А и Б су складиштени у дејонизованој води, а узорци у групама Ц, Д, Е су били третирани према претходно описаном протоколу.

Хумани гингивални фибробласти, претходно изоловани из ткива гингиве, су коришћени у истраживању. Коришћене су ћелије од 3. до 5. пасаже култивисане у стандардним условима у влажној атмосфери са 5% CO₂ на 37 °C. Ћелије су култивисане у основном медијуму *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*, допуњене са 10% говеђег серума (*Fetal Bovine Serum - FBS*), и 100 U/mL пеницилин-стрептомицин раствора. Све компоненте су набављене од *Invitrogena (Thermo Fisher Scientific, Волтам, МА, САД)*.

3.7.1. Митохондријална активност (МТТ)

За процену ћелијске вијабилности коришћен је тест митохондријалне активности (МТТ тест). Припремљени, стерилни узорци су постављени у бунаре са 48 поља. Ћелије су засејаване на површини узорака у концентрацији 10 000 ћелија/cm² и култивисане у условима 5% CO₂ на 37 °C. Након 24 сата медијум је уклоњен, а медијум који садржи 3-(4,5-диметилтиазол-2-ул)-2,5 дифенилтетразолиум бромид (МТТ, 0,5 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*, Ст. Луис, САД) је додат сваком бунару, и инкубиран током 4 сата. Након инкубације, супернатант је уклоњен, а сваком бунару додато по 100 µL диметил сулфоксида) како би се растворили формазански кристали. Плоче су постављене на мешалицу током 20 минута, на 250 обртаја/мин, у мраку, на 37 °C. Очитавање оптичке густине (енгл. *OD*) је вршено на 540 nm користећи спектрофотометријски читач RT - 2100с (Рајто, Кина; слика 18). Шест бунара без узорака је коришћено као унутрашња контрола експеримента. Процент митохондријалне активности у групама Б, Ц, Д, Е је израчунат као разлика у односу на контролну групу А (интактна глеђ). Процент вијабилних ћелија израчунат је коришћењем следеће формуле:

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = (\text{OD (узорак)} / \text{OD (контрола)}) \times 100.$$



Слика 18. Очитавање оптичке густине.

3.7.2. Адхезија фибробласта за површину узорака (Скенинг електронска микроскопија)

Узорци су припремљени на идентичан начин као и за тест митохондријалне активности. Након 24 сата гајења ћелија на узорцима, извршена је фиксација 2% глутаралдеhidом у трајању од 2 сата, на + 4 °C, након чега су узорци излагани растућим концентрацијама алкохола (30%, 50%, 70%, 90% и 100%) у трајању од по 10 минута. Након 72 сата гајења ћелија на узорцима, на преосталих 5 узорака, поновљена је идентична процедура фиксације ћелија 2% глутаралдеhidом у трајању од 2 сата, на + 4°C, након чега су узорци излагани растућим концентрацијама алкохола (30%, 50%, 70%, 90% и 100%) у трајању од по 10 минута. Тако припремљени узорци су

посматрани скенинг електронским микроскопом (СЕМ) како би се утврдило да ли има фибробласта на површини глеђи у испитиваним групама, тј. да ли је примена различитих тертмана беле мрље утицала на њихову адхезију за површину глеђи. СЕМ анализа је одрађена на Одељењу за физику и математику Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

3.8. Статистичка обрада података

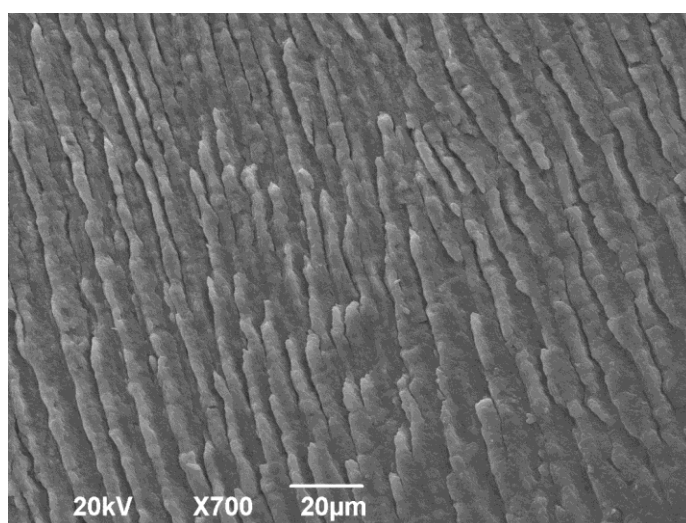
Статистичка анализа прикупљених података извршена је одговарајућим статистичким тестовима у програмском пакету *SPSS za Windows* (IBM Corp, IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0, Њујорк, САД). У овом истраживању коришћене су дескриптивне и аналитичке статистичке методе. Од дескриптивних коришћени су апсолутни и релативни бројеви (n , проценат), мере централне тенденције (аритметичка средина, медијана) и мере варијабилитета (стандардна девијација, интерквartilни распон). Избор одговарајућих статистичких тестова који су коришћени зависио је од природе расподеле података добијених истраживањем. Нормалност података процењивана је *Kolmogorov–Smirnov* тестом. За податке који се понашају по нормалном типу расподеле коришћен је параметарски тест једнофакторска анализа варијансе (енгл. *One-way ANOVA*), уз коришћење *Bonferroni* теста за вишеструка поређења, док је за податке који одступају од нормалне расподеле коришћен *Kruskal–Wallis* тест (уз *Mann-Whitney U* тест за вишеструка поређења). Вредност p мања од 0,05 сматрана је статистички значајном.

Резултати су приказани табеларно и графички.

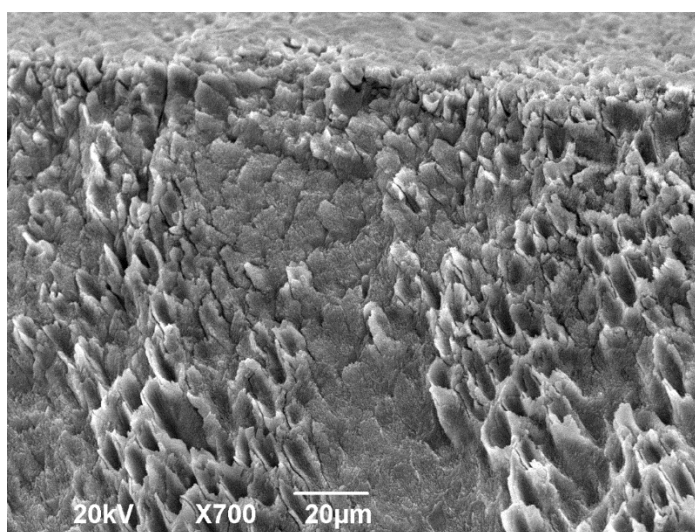
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Морфолошке промене глеђи након испитиваних третмана беле мрље методом скенинг електронске микроскопије (СЕМ)

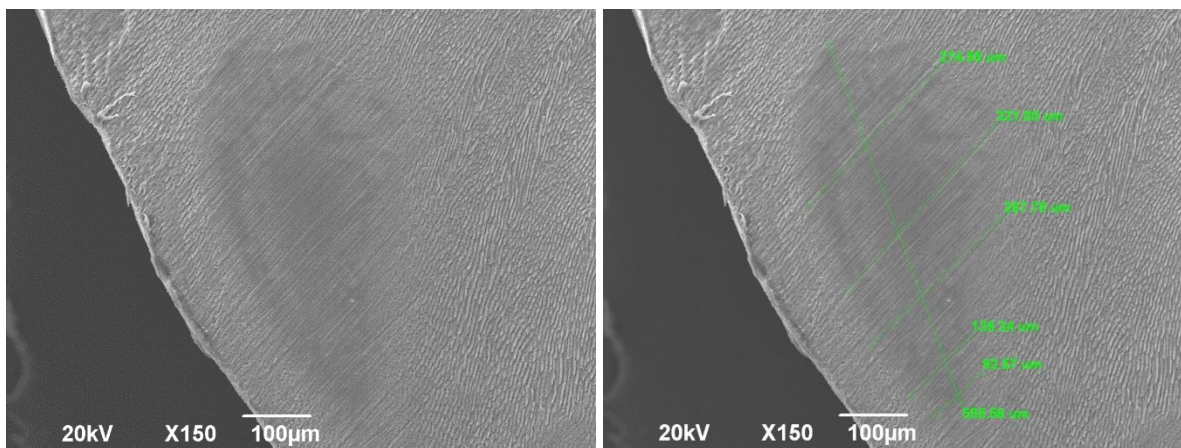
Интактна глеђ на попречном пресеку показала је правилан изглед глеђних призми без зона деминерализације у субповршинским слојевима (Слика 19). На слици 20 види се другачији приказ глеђних призми, са проширеним интерпризматичним просторима који одговарају зонама деминерализације и формирању почетне каријесне лезије глеђи. На слици 21 је приказан изглед беле мрље на попречном пресеку, на мањем увећању, где се уочава зона измењене грађе глеђних призми испод интактне површине глеђи. У групи Ц су се могли уочити, у неким деловима, мање изражени интерпризматични простори (Слика 22).



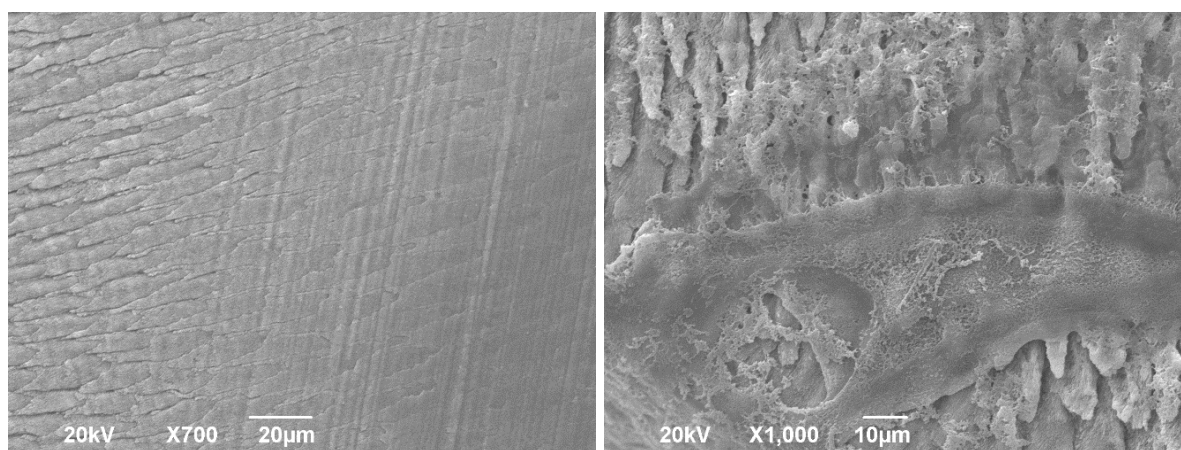
Слика 19. Попречни пресек здраве глеђи – приказ правилно постављених глеђних призми (група А).



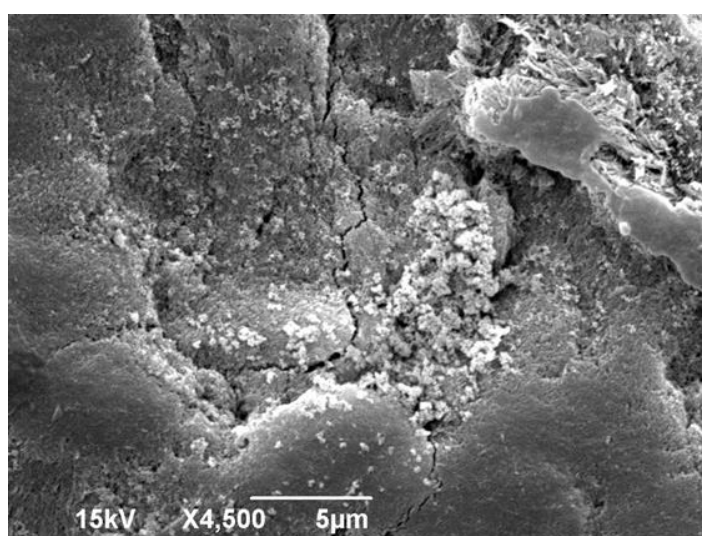
Слика 20. Попречни пресек беле мрље, уочава се проширење интерпризматичних простора као последица деминерализације у потповршинском слоју глеђи (група Б).



Слика 21. Попречни пресек беле мрље посматран на мањем увећању (слика десно са обележеним димензијама).

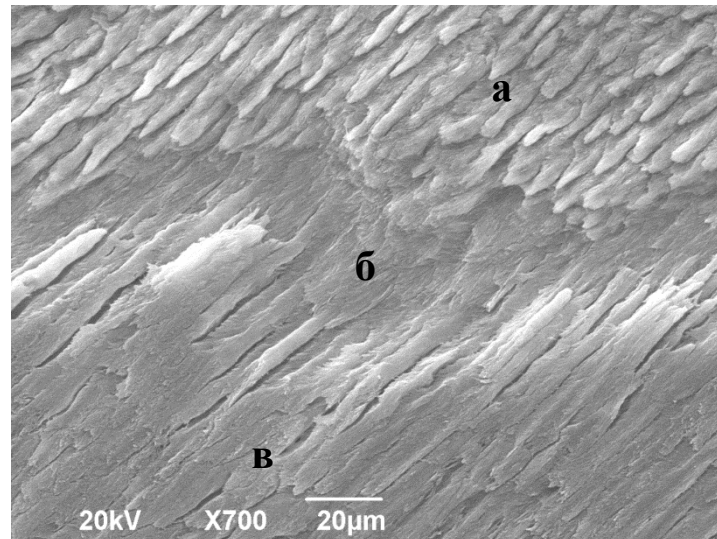


Слике 22. Попречни пресек беле мрље третиране лаком са флуором (група Ц).

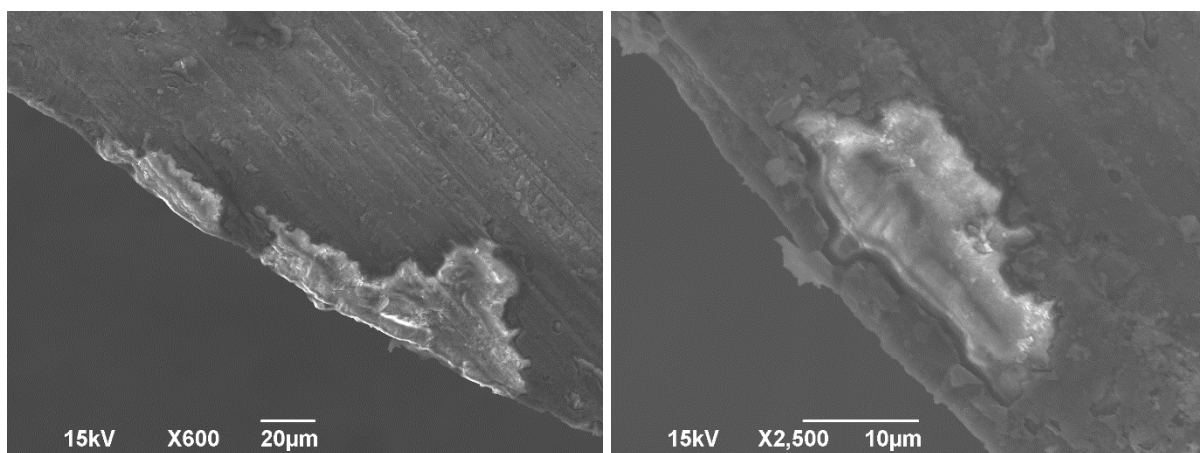


Слика 23. У потповршинском делу беле мрље уочавају се глобуле наталоженог калцијум-фосфата (група Д).

У групи Д промене у структури глеђи су се могле уочити на већим увеличањима, у односу на групе А, Б, Ц и Е. На већем увеличању уочавају се формиране глобуле калцијум-фосфата (Слика 23). На сликама 24 и 25 приказан је налаз у групи Е. На слици 24 уочава се зона интактних, правилно распоређених, глеђних призми, затим зона која се налази између интактне глеђи и смоле и нисковискозном смолом инфилтрирана деминерализована површина. На слици 25 уочава се инфилтрациона смола у површинском и субповршинском слоју почетне каријесне лезије глеђи, посматрана под другачијим условима (контраст, осветљење) у односу на претходно описану слику 24.



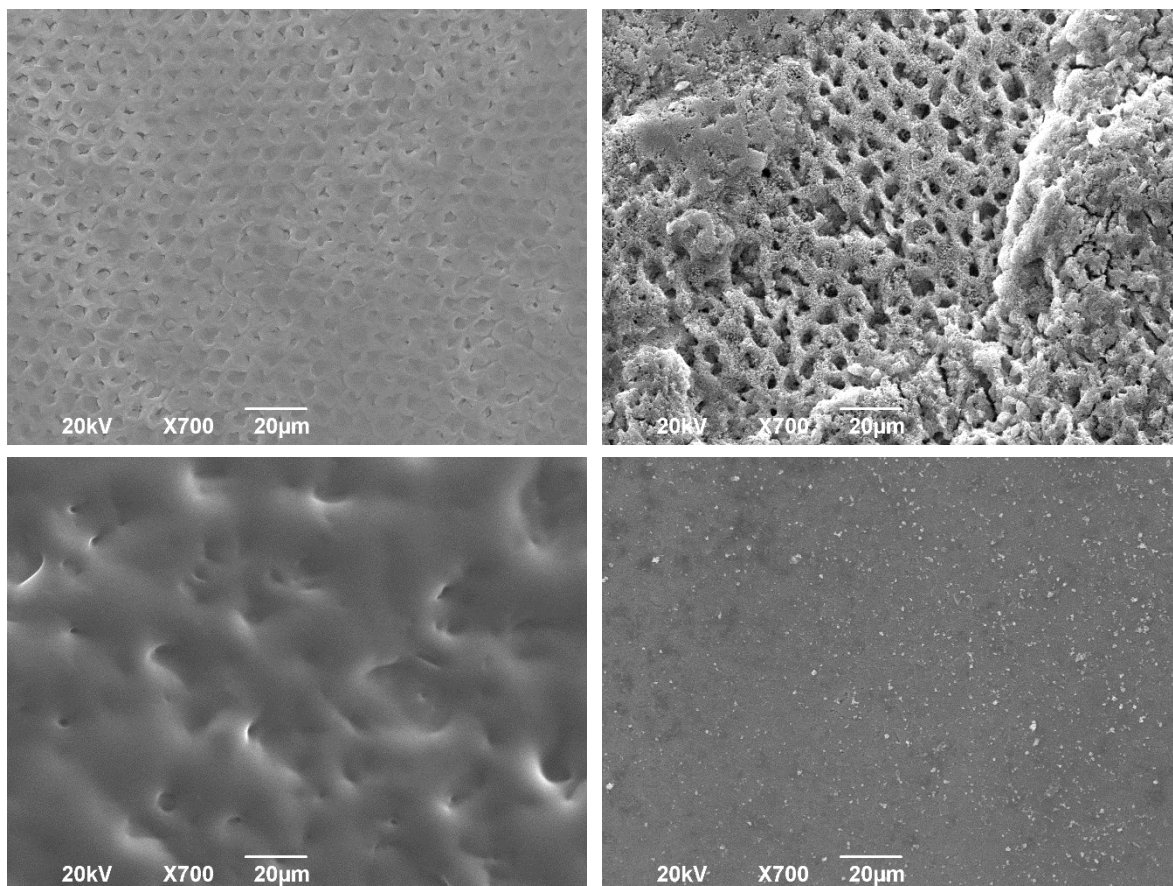
Слика 24. На попречном пресеку уочава се изглед здраве глеђи и положај глеђних призми (а), међуспој (б) и зона беле мрље која је инфилтрирама композитном смолом (в) – група Е.



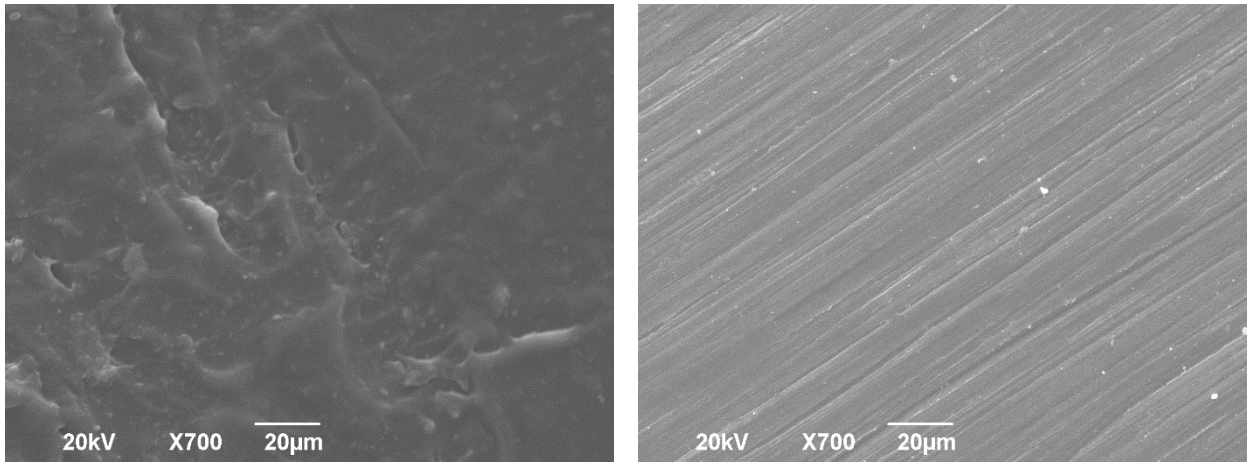
Слика 25. Композитном смолом инфилтриране беле мрље (група Е), посматране на различитим увеличањима. Светлије зоне одговарају нисковискозној смоли.

На СЕМ-у су се могле уочити морфолошке карактеристике површине глеђи и разлике међу испитиваним групама. Површина беле мрље у односу на површину интактне глеђи је неравна, са фокалним зонама ерозивних промена. У неким деловима је очуван изглед површине глеђи, али

предоминантно се уочавају последице дејства раствора за деминерализацију. У односу на морфолошке карактеристике површине беле мрље, након третмана лаком са флуором и пастом са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом уочавају се јасне промене. У групи Ц видљив је равномеран слој који прекрива површину глеђног модела. У групи Д се могу видети преципитати калцијум-фосфата и релативно равна површина без зона експонираних глеђних призми. На слици 26 је приказан изглед површине глеђи у групама А, Б, Ц и Д. У групи Е, површина након инфилтрације и полирања има уједначен изглед целог глеђног модела (Слика 27).



Слика 26. Горе лево: површина интактне глеђи; горе десно: површина беле мрље; доле лево: површина беле мрље након третмана лаком са флуором; доле десно: површина беле мрље након третмана пастом са казеинфосфопептидом аморфним калцијум фосфатом.



Слика 27. Површина беле мрље након инфилтрације композитном смолом: лево – пре полирања; десно – након полирања.

4.2. Испитивање микротврдоће глеђи

Највеће вредности микротврдоће глеђи уочене су у групи А (здрава глеђ) и у групи Е (композитном смолом третиране беле мрље). Средња вредност микротврдоће је била нешто већа у групи Е ($68,23 \pm 21,45$) у односу на групу А ($63,57 \pm 18,89$). Између ове две групе није уочена статистички значајна разлика ($p > 0,05$).

Мерење микротврдоће глеђи у групама Ц (лак са флуоридима) и Д (казеин фосфопептид-аморфни калцијум фосфат) је показало сличне вредности (Табела 8, Графикон 1). Најниже вредности микротврдоће су измерене у групи Б (беле мрље).

Уочена је статистички значајна разлика у вредности микротврдоће глеђи између групе А и групе Б, као и између групе Е и групе Б ($p < 0,05$; Табела 8).

Коришћен је једнофакторски *ANOVA* тест, уз *Post-Hoc Bonferroni* тест за вишеструка поређења.

Табела 8. Вредности микротврдоће глеђи и поређења међу групама.

	Група А Здрава глеђ	Група Б Беле мрље	Група Ц Лак са флуором	Група Д СРР-АСР паста	Група Е Композитна смола
Средња вредност	63,57	42,35	50,84	50,99	68,23
Стандардна девијација	18,89	17,98	14,35	15,31	21,45
Медијана	61,76	35,47	44,29	50,26	68,78
Интерквартилни распон	28,22	21,95	22,37	22,78	28,66
p			0,001*		
p1		0,017*	0,537	0,567	1,000
p2			1,000	1,000	0,002*
p3				1,000	0,092
p4					0,098

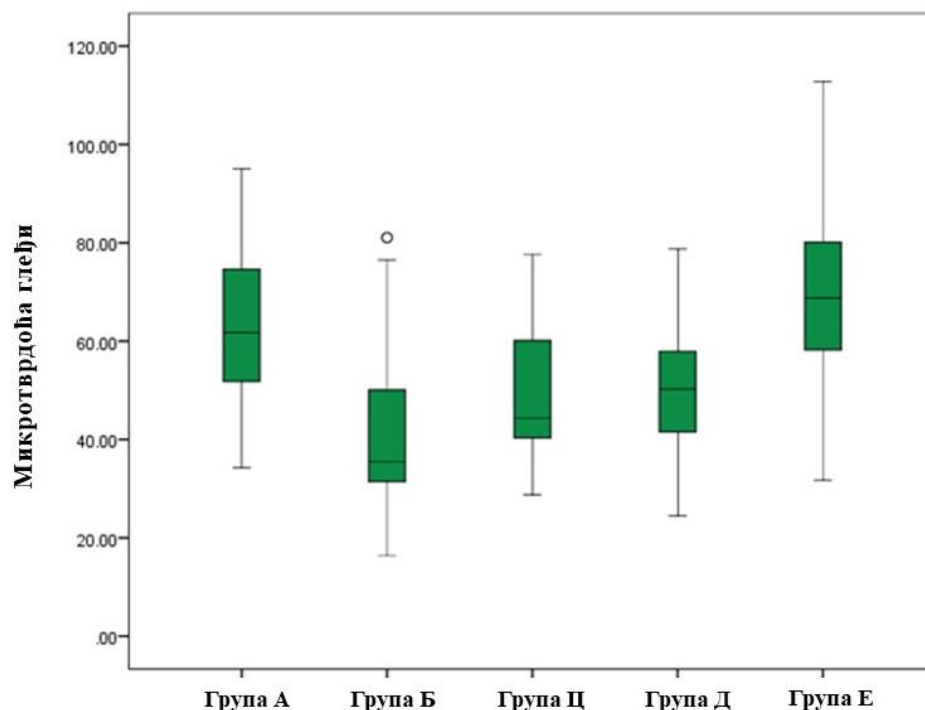
p1: поређење групе А и других група;

p2: поређење групе Б са групама Ц, Д и Е;

p3: поређење групе Ц са групама Д и Е;

p4: поређење групе Д са групом Е;

*статистички значајна разлика $p < 0,05$



Графикон 1. Резултати мерења микротврдоће глеђи (медијана, минимална и максимална вредност).

4.3. Испитивање пријемчивости за формирање биофилма

4.3.1. Испитивање пријемчивости за формирање биофилма – *Streptococcus mutans*

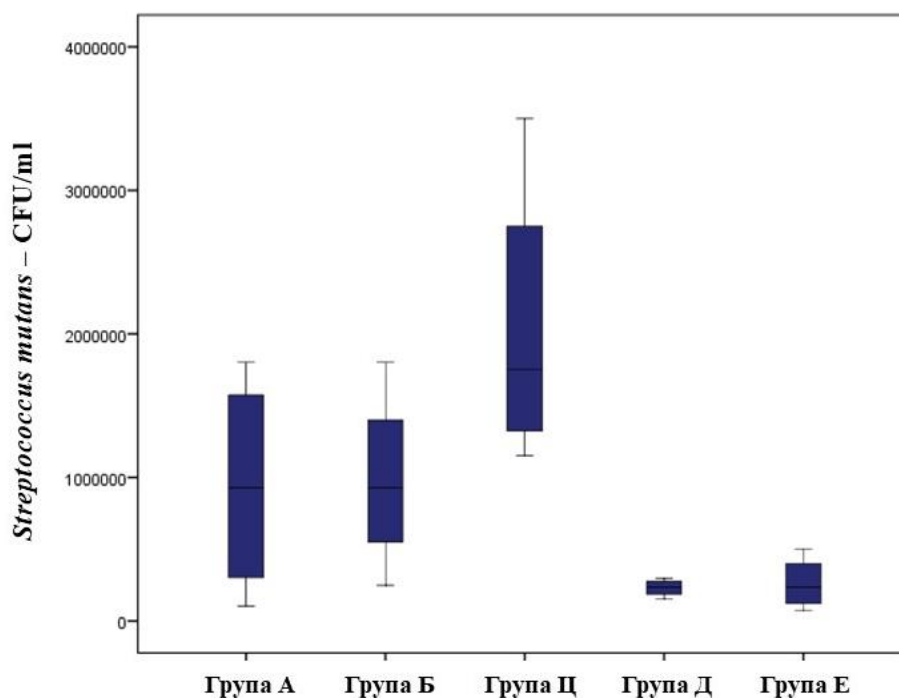
4.3.1.1. Квантификација *Streptococcus mutans* бројањем по милилитру узорка (CFU/ml)

Испитивање пријемчивости за формирање биофилма бактерије *Streptococcus mutans* је показало различите вредности међу испитиваним групама, при чему је разлика у броју бактерија по милилитру узорка (CFU/ml) показала статистичку значајност ($p < 0,05$). Коришћен је *Kruskal-Wallis* тест, уз *Mann-Whitney U* тест за даља поређења међу групама. Статистички значајна разлика је утврђена између групе Ц - лак са флуором и групе Д - аморфни калцијум фосфатом казеин фосфопептид, затим између групе Ц - лак са флуором и групе Е - инфилтрација композитном смолом (Табела 9). Насупрот томе, није уочена статистички значајна разлика у квантификацији бактерија између здраве глеђи и белих мрља третираних на различите начине (лак са флуором, аморфни калцијум фосфатом казеин фосфопептид, инфилтрација композитном смолом). Најмањи број бактерија је уочен у групама Д и Е, док је највећи број у групи Ц (Графикон 2).

Табела 9. Квантификација *S. mutans* – CFU/ml

	Група А Здрава глеђ	Група Б Беле мрље	Група Ц Лак са флуором	Група Д СРР-АСР паста	Група Е Композитна смола
Средња вредност	938.750	975.000	2.037.500	231.250	261.250
Стандардна девијација	774.277,89	638.357,27	1.035.515,17	62.500	184.859,18
Медијана	925.000	925.000	1.750.000	237.500	237.500
Интерквартилни распон	1.483.750	1.200.000	1.887.500	118.750	353.750
p			0,032*		
p1		0,885	0,149	0,248	0,191
p2			0,083	0,059	0,083
p3				0,021*	0,021*
p4					0,885

p1: поређење групе А и других група;
 p2: поређење групе Б са групама Ц, Д и Е;
 p3: поређење групе Ц са групама Д и Е;
 p4: поређење групе Д са групом Е;
 *статистички значајна разлика $p < 0,05$



Графикон 2. Графички приказ квантификације (CFU/ml) за *S. mutans* (медијана, минимална и максимална вредност).

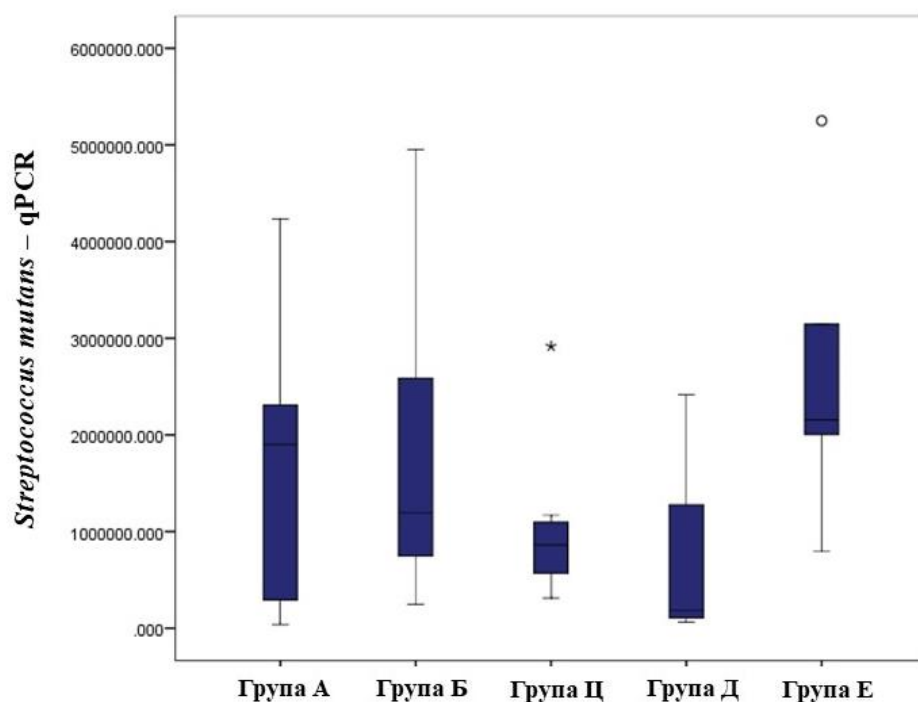
4.3.1.2. Квантификација *Streptococcus mutans* методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену

Ова анализа је показала да постоји статистички значајна разлика у вредностима броја бактерије *Streptococcus mutans* међу испитиваним групама ($p < 0,05$). Коришћен је *Kruskal-Wallis* тест, уз *Mann-Whitney U* тест за даља поређења међу групама. Статистички значајна разлика уочена је између група Б и Д, затим између група Ц и Е и група Д и Е. У табели 10 и на графикону 3 су приказани добијени резултати.

Табела 10. Квантификација *S. mutans* методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену.

	Група А Здрава глеђ	Група Б Беле мрље	Група Ц Лак са флуором	Група Д СРР-АСР паста	Група Е Композитна смола
Средња вредност	1.625.854,94	1.781.235,21	1.036.567,30	700.283,64	2.583.699,21
Стандардна девијација	1.526.734,26	1.540.587,64	812.470,93	1.037.703,09	1.307.609,30
Медијана	1.902.132	1.187.185,75	863.362,72	181.067,52	2.160.000,23
Интерквартилни распон	2.322.009,78	1.881.719,46	641.738,50	1.719.092,16	1.170.569,38
р			0,040*		
р1		0,613	0,779	0,397	0,232
р2			0,442	0,021*	0,195
р3				0,059	0,015*
р4					0,021*

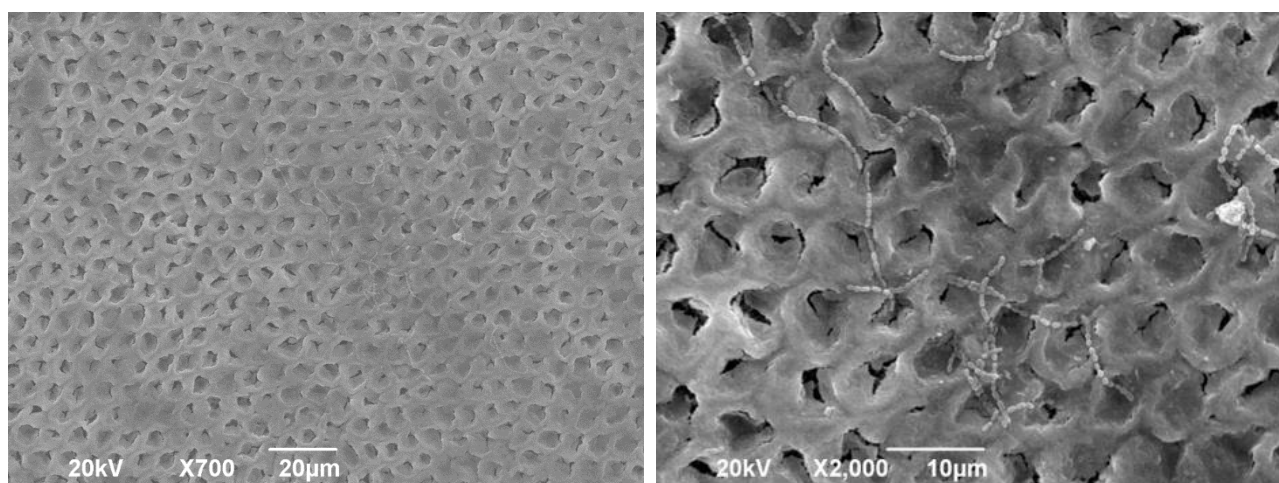
р1: поређење групе А и других група;
 р2: поређење групе Б са групама Ц, Д и Е;
 р3: поређење групе Ц са групама Д и Е;
 р4: поређење групе Д са групом Е;
 *статистички значајна разлика $p < 0,05$



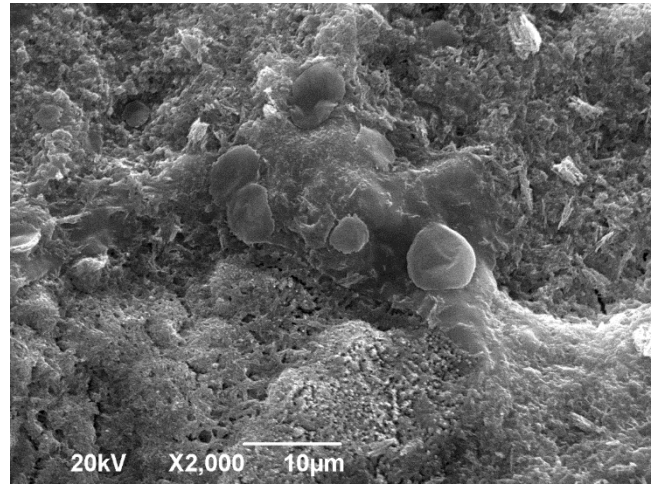
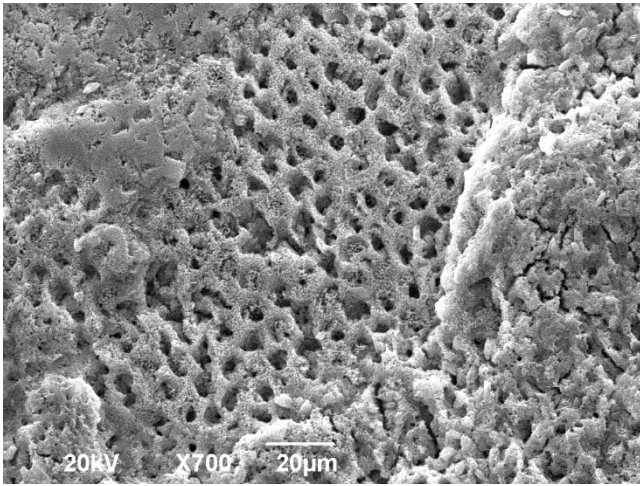
Графикон 3. Графички приказ квантификације за *S. mutans* (медијана, минималне и максималне вредности).

4.3.1.3. СЕМ анализа биофилма

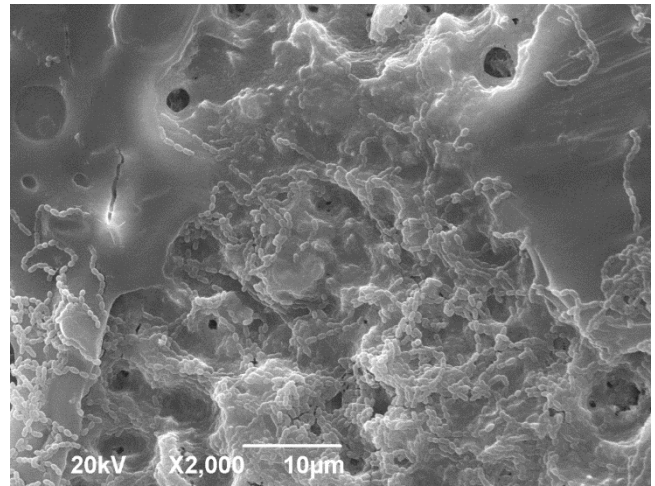
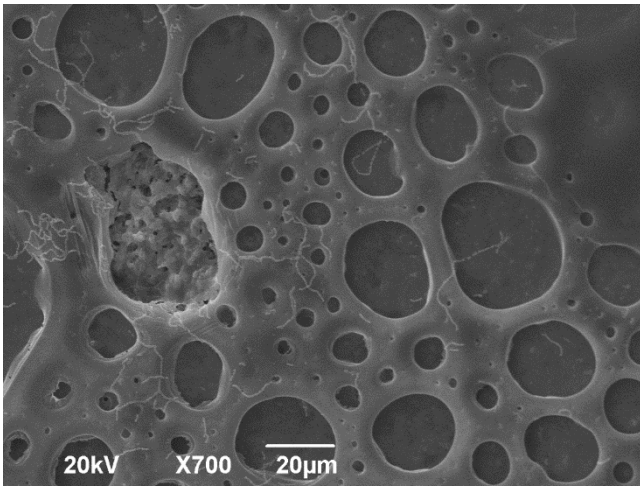
На скенинг електронском микроскопу је потврђено формирање мономикробног бактеријског биофилма. Уочен је сферичан облик бактерије *S. mutans*, које су организоване у краће или дуге ланце, у зависности од степена формирања биофилма. Површина бактеријских ћелија може бити релативно глатка или зрнаста, што указује на продукцију екстраћелијских полисахарида.



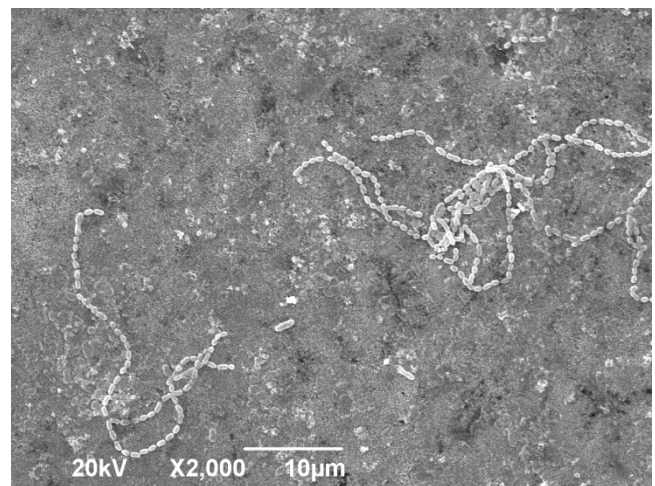
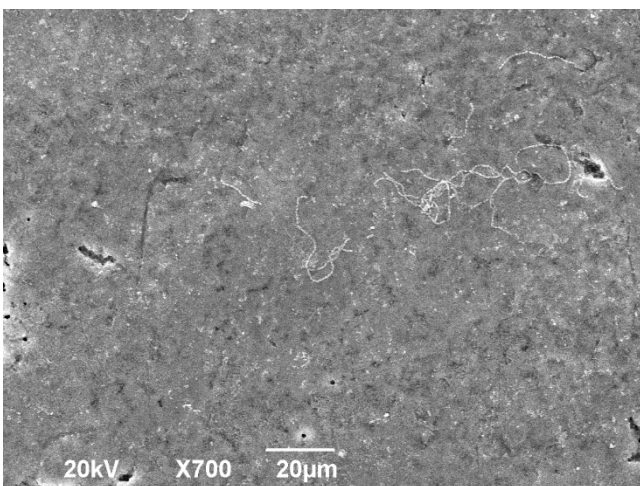
Слике 28, 29. Приказ *S. mutans* на здравој глеђи (група А), на различитим увећањима.



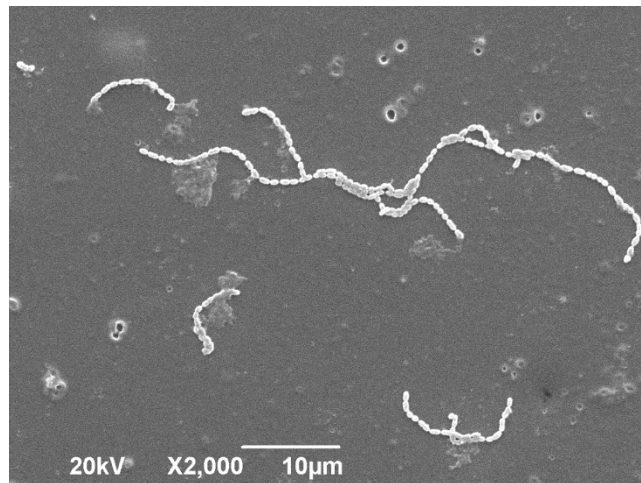
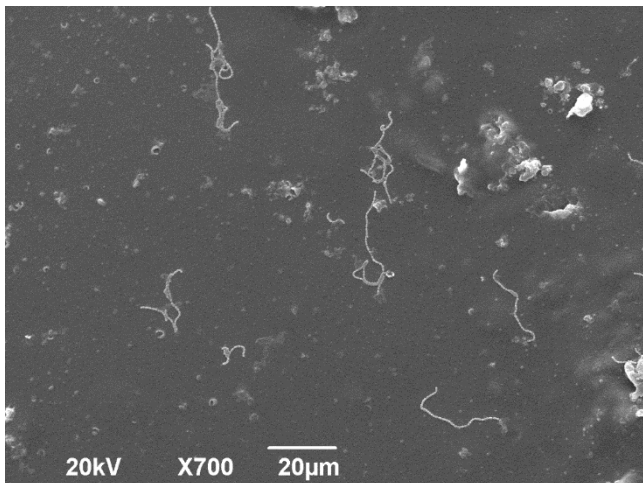
Слике 30, 31. Приказ *S. mutans* на површини беле мрље (група Б), на различитим увеличањима.



Слике 32, 33. Приказ *S. mutans* на површини беле мрље третиране лаком са флуором (група Ц), на различитим увеличањима.



Слике 34, 35. Приказ *S. mutans* на површини беле мрље третиране пастом са казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом (група Д), на различитим увеличањима.



Слике 36, 37. Приказ *S. mutans* на површини беле мрље инфилтриране композитном смолом (група Е), на различитим увељичањима.

4.3.2. Испитивање пријемчивости за формирање биофилма – *Candida albicans*

4.3.2.1. Квантификација *Candida albicans* бројањем по милилитру узорка (CFU/ml)

Испитивањем пријемчивости површине за формирање мономикробног биофилма (*Candida albicans*), уочена је статистички значајна разлика у броју овог микроорганизма по милилитру узорка међу испитиваним групама ($p < 0,05$). Коришћен је *Kruskal-Wallis* тест, уз *Mann-Whitney U* тест за даља поређења међу групама (Табела 11, Графикон 4).

Табела 11. Квантификација *C. albicans* – CFU/ml

	Група А Здрава глеђ	Група Б Беле мрље	Група Ц Лак са флуором	Група Д СРР-АСР паста	Група Е Композитна смола
Средња вредност	575.000	2.400.000	450.000	737.500	4.875.000
Стандардна девијација	337.885,58	1.518.771,43	282.842,71	426.956,28	2.250.000
Медијана	575.000	2.000.000	350.000	850.000	5.000.000
Интерквartilни распон	650.000	2.800.000	500.000	787.500	4.125.000
p			0,006*		
p1		0,021*	0,772	0,564	0,020*
p2			0,020*	0,029*	0,081
p3				0,384	0,019*
p4					0,020*

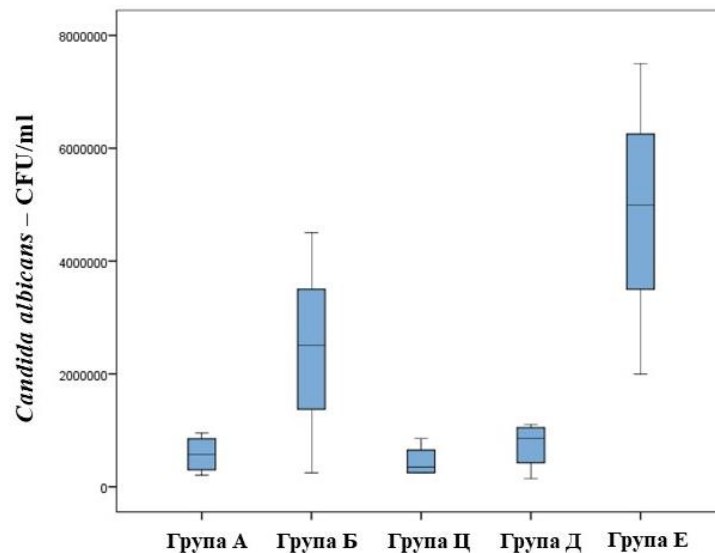
p1: поређење групе А и других група;

p2: поређење групе Б са групама Ц, Д и Е;

p3: поређење групе Ц са групама Д и Е;

p4: поређење групе Д са групом Е;

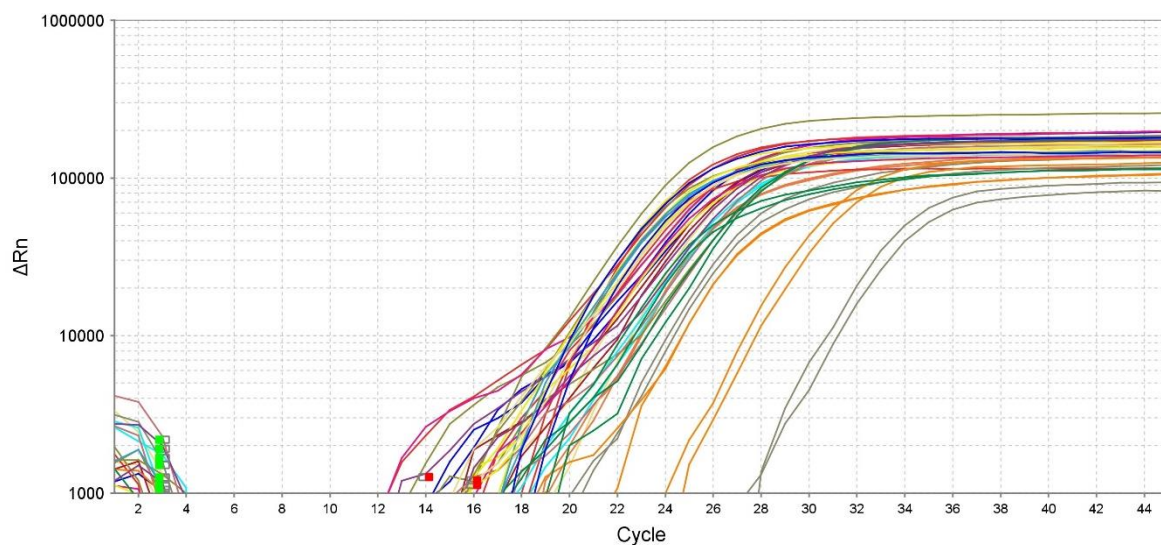
*статистички значајна разлика $p < 0,05$



Графикон 4. Графички приказ квантификације (CFU/ml) за *C. albicans* (медијана, минимална и максимална вредност).

4.3.2.2. Квантификација *Candida albicans* методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену

Ова анализа је показала да постоји статистички значајна разлика у броју *C. albicans* међу тестираним групама ($p < 0,05$). Коришћен је *Kruskal-Wallis* тест, уз *Mann-Whitney U* тест за даља поређења међу групама (Табела 12). Утврђено је да је површина беле мрље инфилтрирана композитном смолом статистички значајно пријемчивија за формирање овог мономикробног биофилма у односу на преостале групе. Међу групама А, Б, Ц и Д није уочена статистички значајна разлика у броју испитиваног микроорганизама (Табела 12, Графикон 5). Крива умножавања је приказана на слици 38.



Слика 38. Крива умножавања за *C. albicans*.

Табела 12. Квантификација *Candida albicans* методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену

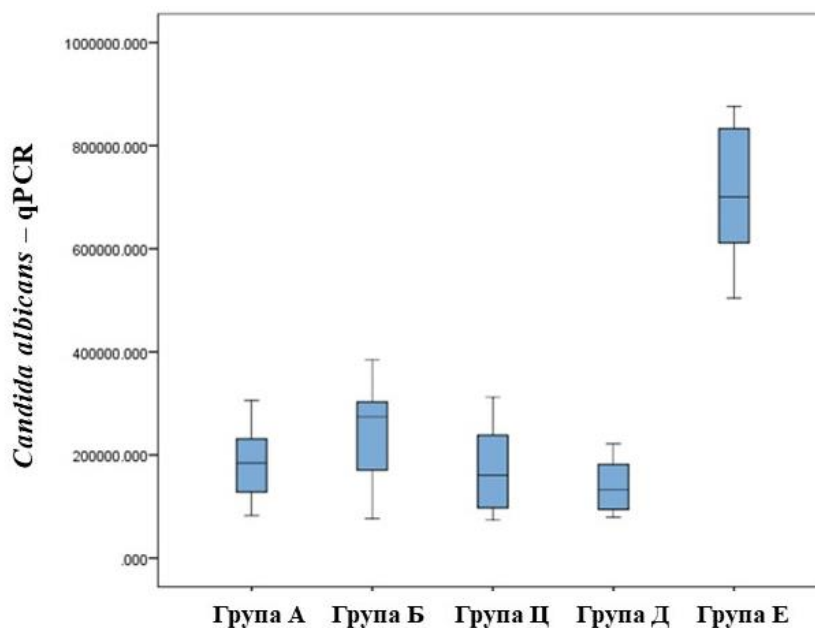
	Група А Здрава глеђ	Група Б Беле мрље	Група Ц Лак са флуором	Група Д СРР-АСР паста	Група Е Композитна смола
Средња вредност	184.569,25	244.381,87	172.735,36	139.888,55	704.562,06
Стандардна девијација	76.057,44	108.344,55	88.989,58	53.944,63	138.170,91
Медијана	184.699,73	273.966,75	161.381,44	133.622,28	701.275,37
Интерквartilни распон	136.027,39	178.855,29	161.534,25	90.749,64	258.691,34
p			0,002*		
p1		0,208	1.000	0,345	0,002*
p2			0,248	0,074	0,002*
p3				0,462	0,002*
p4					0,002*

p1: поређење групе А и других група;

p2: поређење групе Б са групама Ц, Д и Е;

p3: поређење групе Ц са групама Д и Е;

p4: поређење групе Д са групом Е; *статистички значајна разлика $p < 0,05$

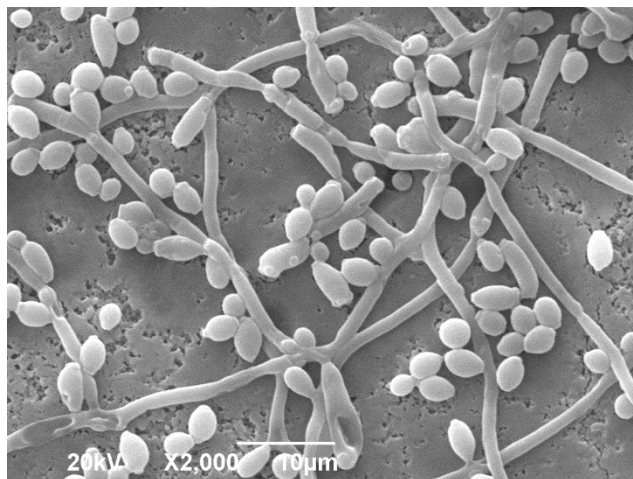
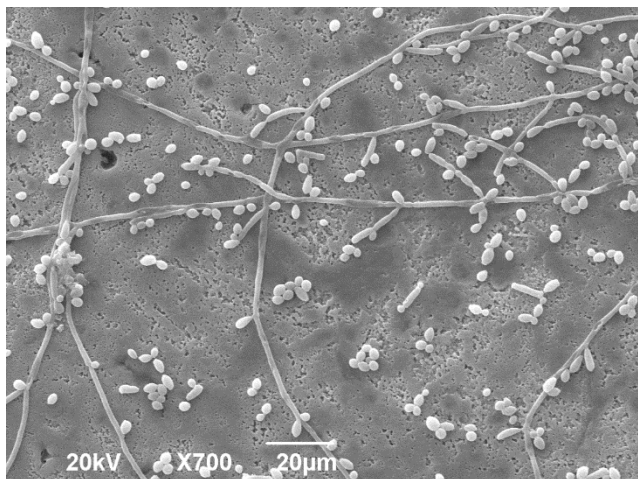


Графикон 5. Графички приказ квантификације (qPCR) за *Candida albicans* (медијана, минимална и максимална вредност).

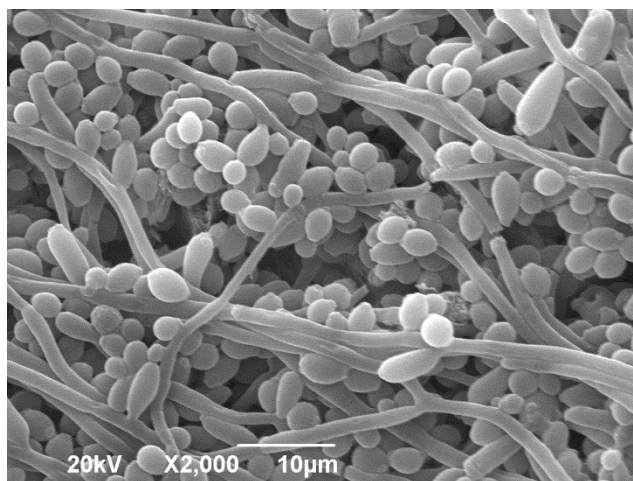
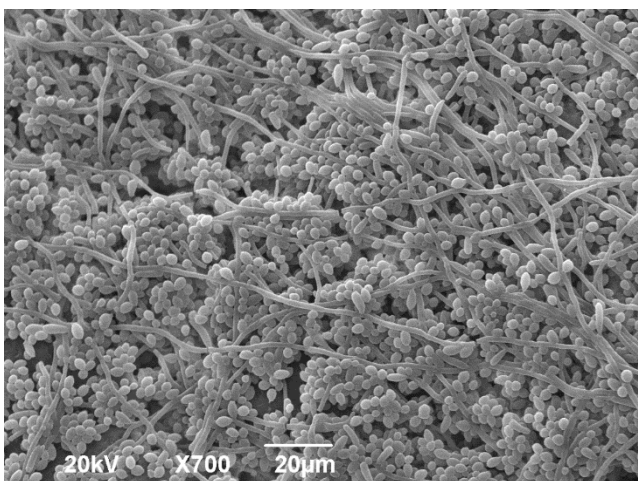
4.3.2.3. СЕМ анализа

На скенинг електронском микроскопу је додатно потврђено формирање мономикробног биофилма. *Candida albicans* показује карактеристичан изглед. Уочене су појединачне округле или

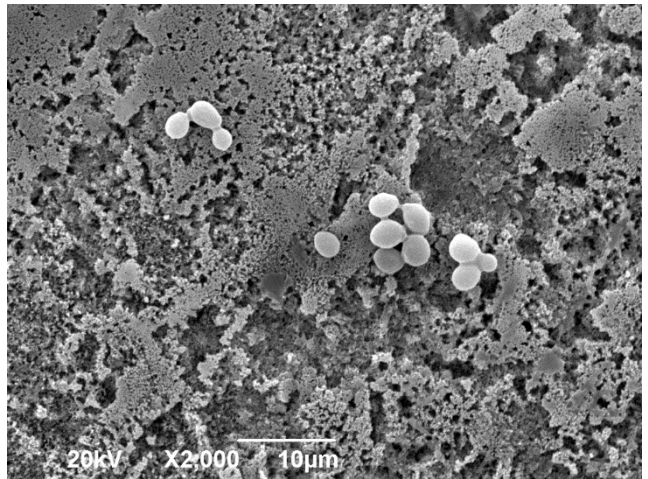
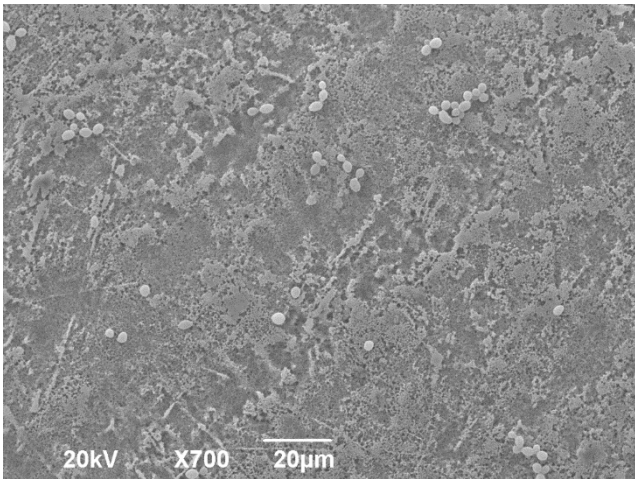
благо издужене ћелије (бластоспоре). У зависности од услова раста, *C. albicans* може испољити и другачији изглед, при чему долази до формирања псеудохифа или правих хифа, које су на SEM-у приказане као издужене, филаментне структуре. Поред тога, у појединим узорцима уочени су знаци пупљења на зидовима бластоспора, што указује на активну пролиферацију ћелија. На сликама 39-48 су приказани добијени резултати.



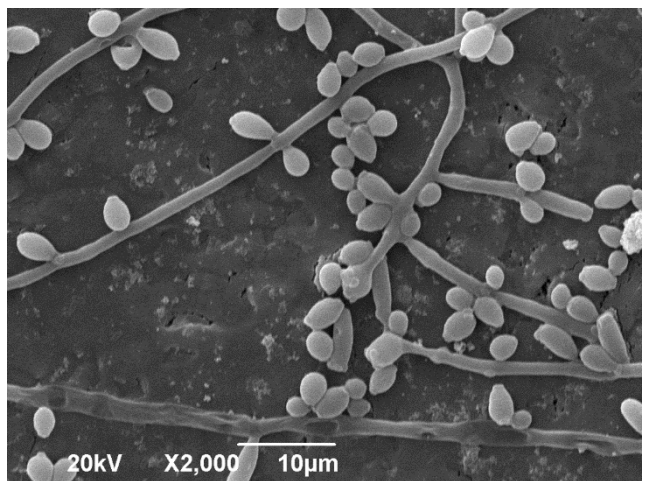
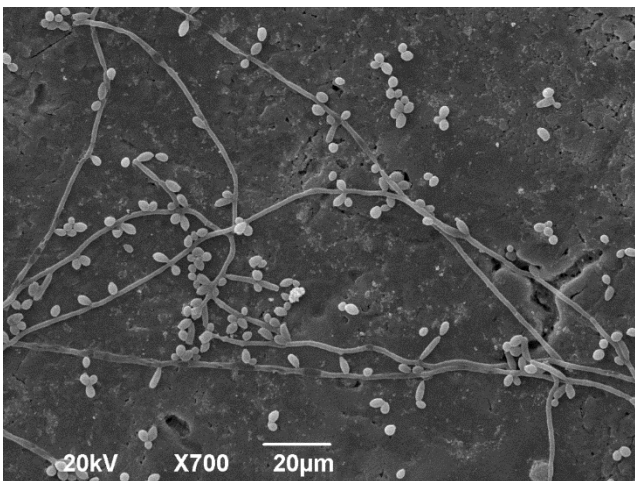
Слике 39, 40. Приказ *C. albicans* на здравој глеђи (група А) на различитим увеличањима.



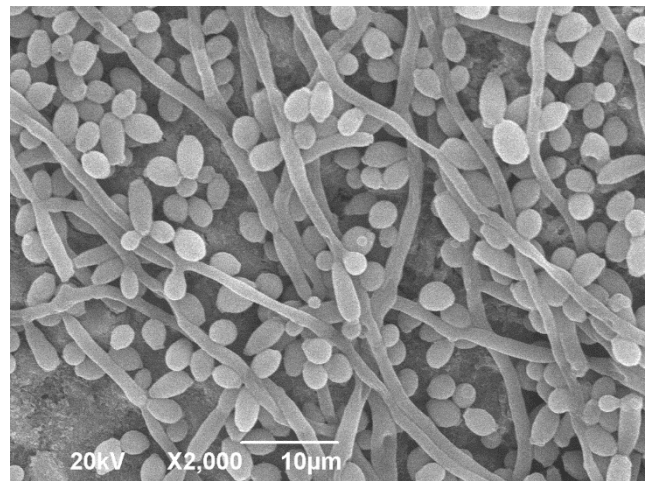
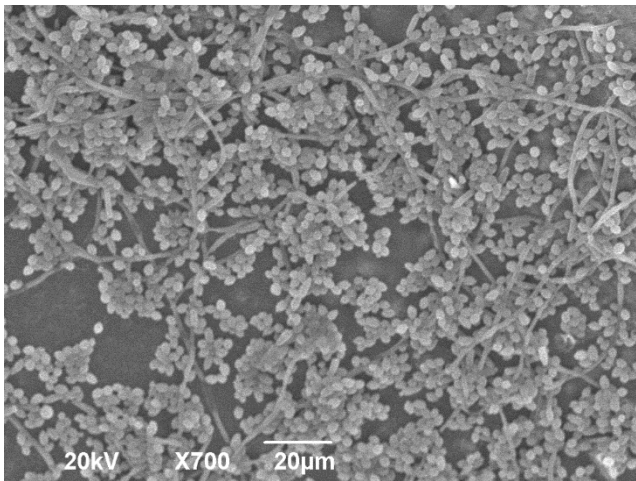
Слике 41, 42. Приказ *C. albicans* на површини беле мрље (група Б) на различитим увеличањима.



Слике 43, 44. Приказ *C. albicans* на површини беле мрље третиране лаком са флуором (група Ц) на различитим увељичањима.



Слике 45, 46. Приказ *C. albicans* на површини беле мрље третиране пастом са казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом (група Д) на различитим увељичањима.



Слике 47, 48. Приказ *C. albicans* на површини беле мрље инфилтриране композитном смолом (група Е) на различитим увељачањима.

4.4. Испитивање утицаја на ћелије хумане гингиве

4.4.1. Митохондријална активност (МТТ)

Процент митохондријалне активности у групи А – интактна глеђ (контролна група) износи 100%. Вредности у преосталим групама су израчунате као разлика у односу на контролну групу (интактна глеђ). Највећу средњу вредност је показала група Ц – 126, 21%, док су групе Б и Д имале нешто ниже вредности (112, 61%, 116, 48%, респективно). Најнижа вредност процента митохондријалне активности уочена је у групи Е – 86, 59% (Табела 13). Није уочена статистички значајна разлика група Б, Д, Е у односу на контролну групу А, али постоји статистички значајна разлика између групе А и групе Ц ($p=0,018$).

Коришћен је једнофакторски *ANOVA* тест, уз *Post-Hoc Bonferroni* тест за вишеструка поређења (Табела 13, Графикон 6).

Табела 13. Процент ћелијске вијабилности.

	Група А Здрава глеђ	Група Б Беле мрље	Група Ц Лак са флуором	Група Д СРР-АСР паста	Група Е Композитна смола
Средња вредност	100	112,61	126,21	116,48	86,59
Стандардна девијација	18,32	13,75	23,23	13,77	11,44
Медијана	108,43	106,68	117,33	110,49	88,08
Интерквartilни распон	32,75	25,91	37,77	19	21,23
p			0,000*		
p1		1,000	0,018*	0,422	0,948
p2			0,906	1,000	0,019*
p3				1,000	0,000*
p4					0,005*

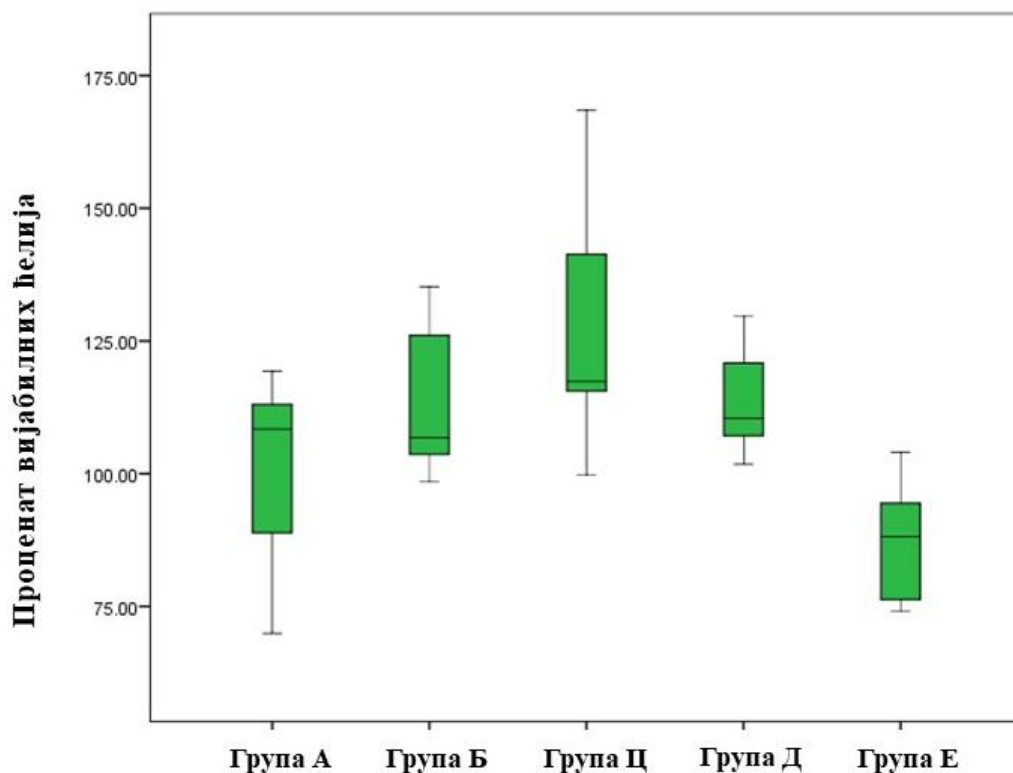
p1: поређење групе А и других група;

p2: поређење групе Б са групама Ц, Д и Е;

p3: поређење групе Ц са групама Д и Е;

p4: поређење групе Д са групом Е;

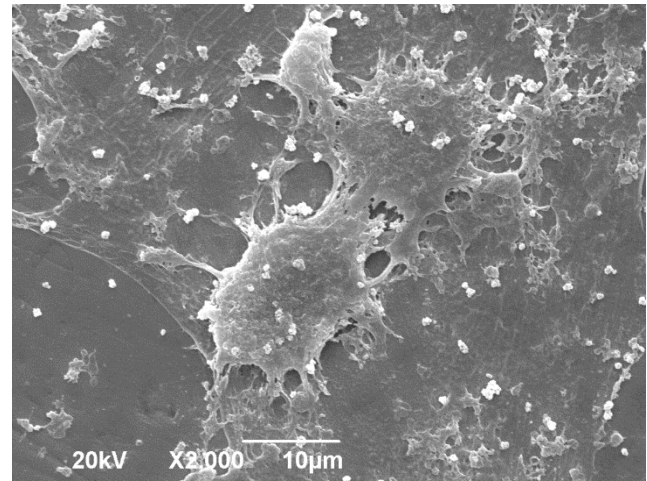
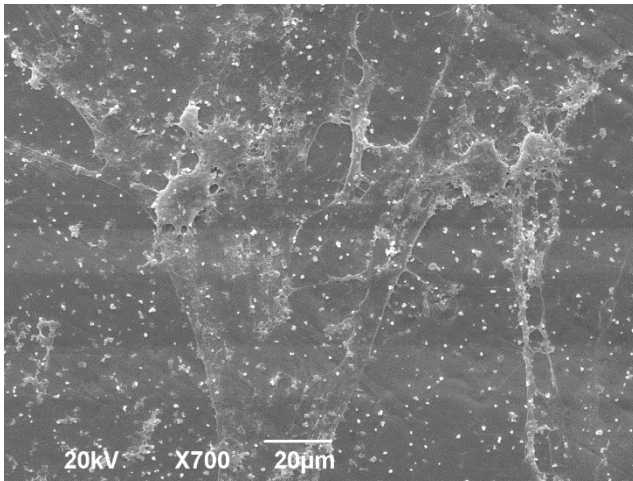
*статистички значајна разлика $p<0,05$



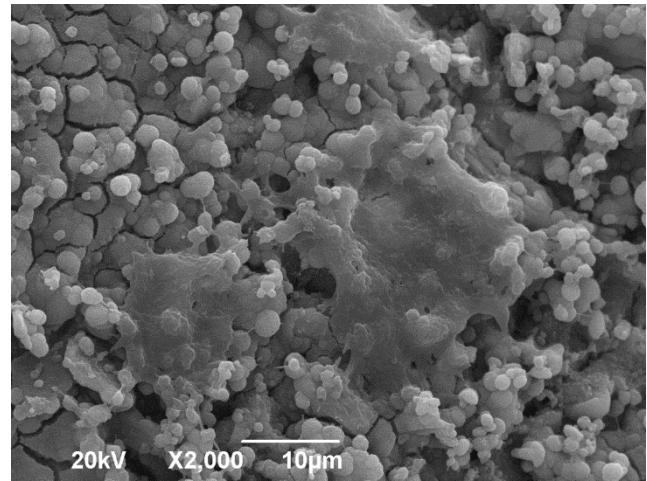
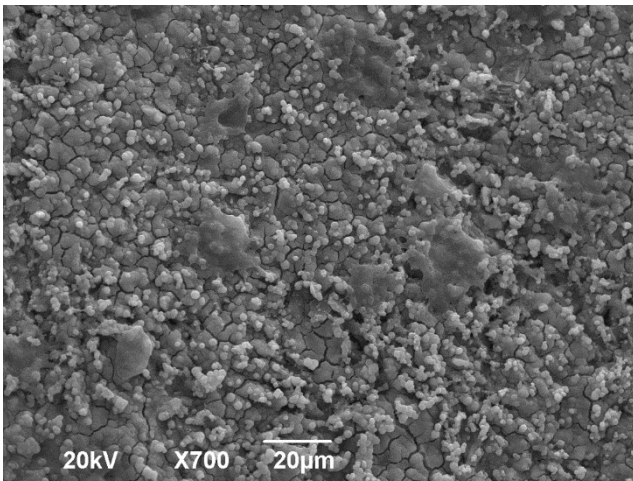
Графикон 6. Процент вијабилних ћелија гингиве – фибробласта (медијана, минимална и максимална вредност).

4.4.2. Адхезија фибробласта за површину узорака (СЕМ анализа)

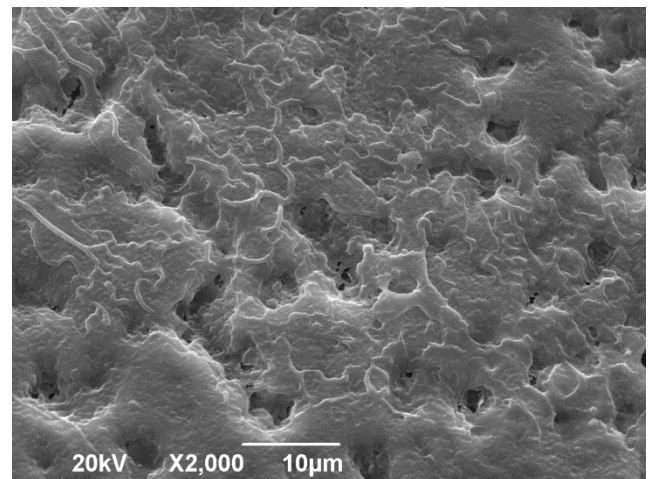
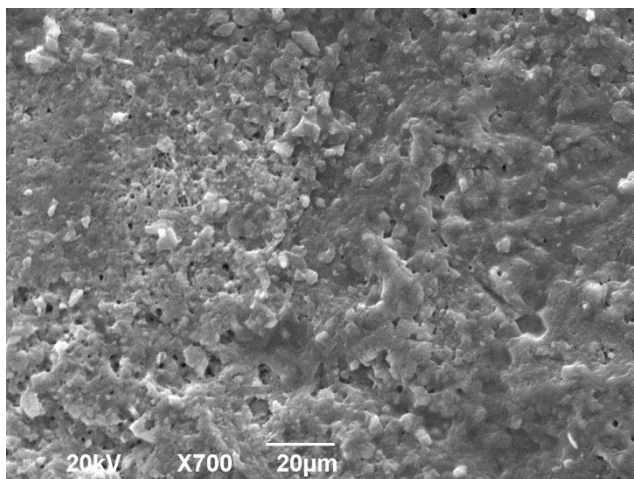
Коришћењем скенинг електронске микроскопије се потврдило присуство хуманих фибробласта на површини узорака, тј. да је дошло до њихове адхезије за површину узорака. На овим препаратима фибробласти изгледају као полигоналне ћелије са мање или више израженим цитоплазматским продужецима. Ови продужеци омогућавају адхезију, миграцију и међућелијске интеракције. На глеђном моделу у групи А (интактна глеђ) може се видети мрежаста распоред међусобно повезаних фибробласта (Слика 49). На већем увећању у истој групи уочава се неравна површина ћелија са благим наборима и браздама (Слика 50). На површини беле мрље (група Б) се уочава нешто мање изражена мрежаста организација, али се јасно уочавају адхериране ћелије (Слика 51, 52). У групи Ц (лак са флуором) фибробласти су сличног изгледа, али су уроњени у слој лака које је видљив на површини препарата (Слика 53, 54). У групи Д не уочавају се изражени продужеци фибробласта, али се уочавају скупине ових ћелија уз глобуле калцијум-фосфата (Слика 55, 56). У последњој групи (Е) може се уочити другачија површина глеђи, која одговара композитној смоли, а на њој груписани фибробласти са мање израженим продужецима (Слика 57, 58).



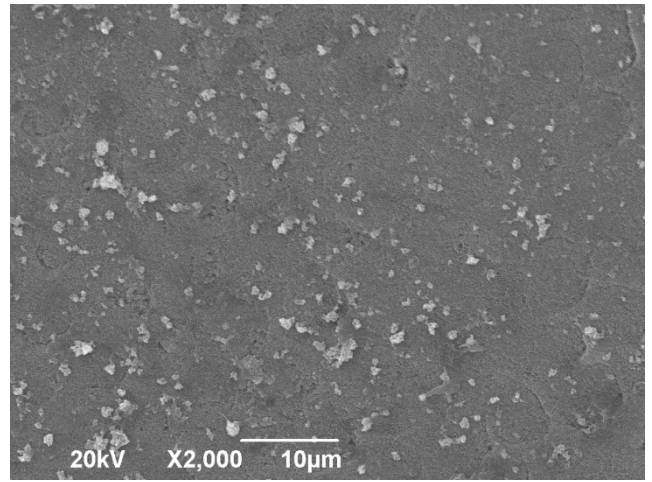
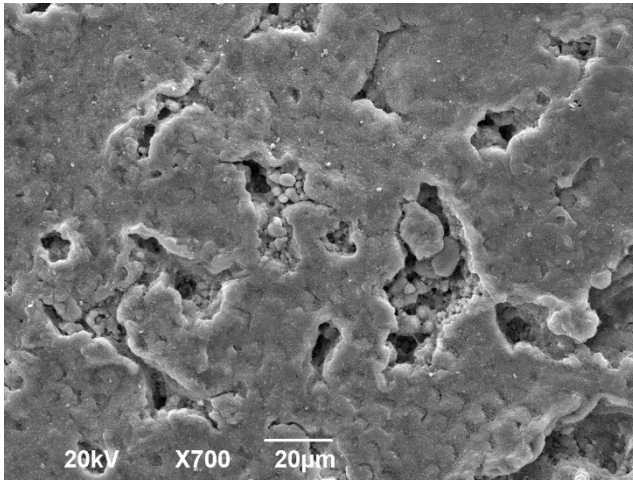
Слике 49, 50. Приказ фибробласта на површини интактне глеђи (група А), на различитим увеличањима.



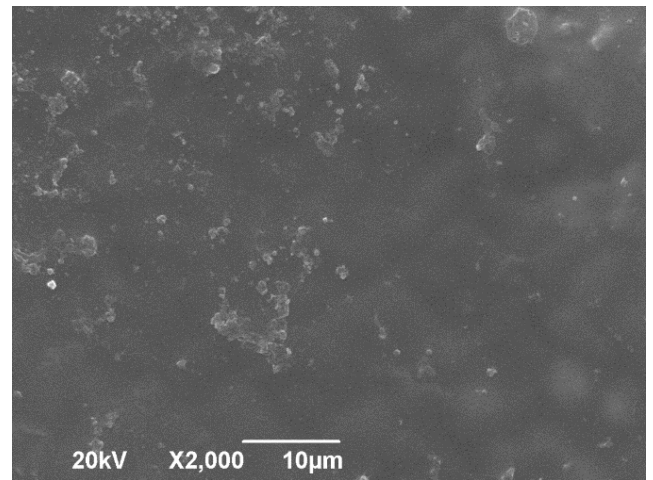
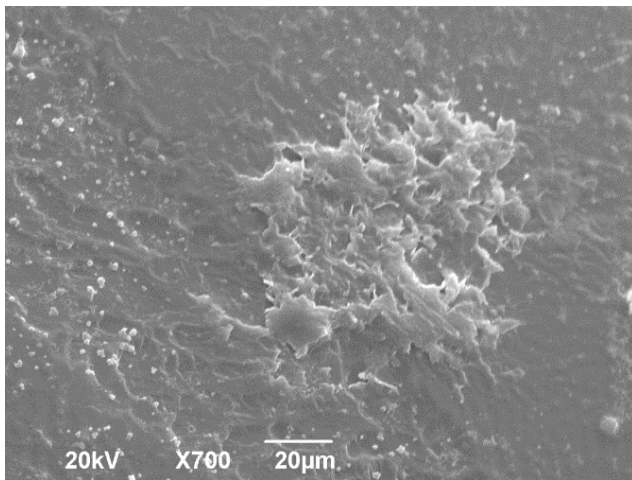
Слике 51, 52. Приказ фибробласта на површини беле мрље (група Б), на различитим увеличањима.



Слике 53, 54. Приказ фибробласта на површини беле мрље третиране лаком са флуором (група Ц), на различитим увеличањима.



Слике 55, 56. Приказ фибробласта на површини беле мрље третиране пастом са казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом (група Д), на различитим увеличањима.



Слике 57, 58. Приказ фибробласта на површини беле мрље инфилтриране композитном смолом (група Е), на различитим увеличањима.

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Избор раствора за деминерализацију

Артифицијелне беле мрље се често користе за различита испитивања и то ради симулирања клиничких услова и испитивања доступних средстава у терапији каријеса. У литератури су описани различити протоколи за њихово *in vitro* формирање, у облику раствора или гела, који се заснивају на дејству сирћетне киселине, млечне киселине, метил дифосфоната, са или без присуства флуорида (114). Фреитас и сарадници су користили метилцелулозни гел, али је показано да његова висока вискозност може утицати на дифузију киселина и на смањење степена деминерализације (115). Иса и сар. су закључили да присуство флуора у процесу деминерализације, посебно уколико се користи гел, значајно умањује дубину насталих лезија и губитак минерала код глеђи сталних зуба (116). Са друге стране, беле мрље са карактеристичним потповршинским телом лезије се могу створити у одсуству флуора, тако да је у овом истраживању одабран протокол за деминерализацију без флуора.

Истраживања су показала да и доступност састојака за деминерализујућа средства може имати значајну улогу у њиховом одабиру (117). У овој пилот студији су испитивани раствори који садрже сирћетну и млечну киселину. Вредност рН коришћених раствора је у складу са препорукама литературе и резултатима спроведене мета-анализе и износи од 4 до 5 (25). Када се посматра трајање процеса деминерализације, постоје различити подаци у доступној научној литератури. Може варирати од неколико до 1.200 сати (25). У спроведеној пилот студији, трајање процеса формирања белих мрља у групи 2 је било 96 сати, као што је описано у неким *in vitro* истраживањима (108, 109, 118). Такође, Бехроузи и сар. су користили раствор истог трајања, али је садржао хидроксиетил-целулозни систем (110). У групи 4 овај временски период је био знатно дужи (21 дан/504 сата), као што је предложено у студији Прајапатија и сарадника. У поменутом истраживању добијене су почетне каријесне лезије глеђи дубине 341 μm . У спроведеној пилот студији, описане почетне каријесне лезије нису створене, на супрот томе, резултат је био формирање кавитираних каријесних лезија.

Просечна дубина насталих белих мрља је износила око 49 μm у групи 2 и око 44 μm у групи 3, што је мање од наведених у неким *in vitro* истраживањима (108, 112). Са друге стране, објављени су и резултати слични онима који су добијени у овој пилот студији. Наиме, Магалхаес и сар. наводе вредности од 35 до 52 μm , осим код примене метил дифосфоната (где су износиле око 86 μm) (114). У групама 2 и 3, СЕМ испитивање је доказало формирање артифицијелних белих мрља са очуваном површином глеђи и потповршинском деминерализацијом са проширеним међукристалним просторима. Код неких узорака у групи 2, уочене су и локалне зоне ерозија на површини глеђи које су окружене очуваним слојем ткива.

Након анализе добијених резултата, закључено је да је раствор у групи 2 (сирћетна киселина, монокалијум фосфат, калцијум хлорид; рН 4,4; трајање 96 сати) дао задовољавајуће резултате са мање израженим ерозивним промена глеђи, те је овај раствор коришћен за креирање почетних каријесних лезија глеђи у наставку истраживања.

5.2. Морфолошке промене глеђи испитиване методом скенинг електронске микроскопије (СЕМ)

Микроинвазивни приступ у терапији белих мрља, односно техника инфилтрације глеђи, подразумева употребу ниско вискозних композитних смола са високим коефицијентом пенетрације. Захваљујући првом кораку у овој техници, тј. третирањем површине глеђи хлороводоничном киселином, постиже се уклањање високоминерализованог површинског слоја глеђи. Управо овај поступак омогућава да се оствари дејство капиларних сила и изврши успешна инфилтрација дубљих, деминерализованих зона. Према неким ауторима, хлороводонична киселина остварује двоструко већи ерозивни учинак у односу на ортофосфорну киселину (27, 119). Такође, у овој техници инфилтрације значајна је примена етанола. Ова фаза, поред дехидратације потповршинске лезије, утиче на смањење контактне угла и побољшање инфилтрације беле мрље композитном смолом (120).

Подаци из литературе указују на успешност инфилтрације артифицијалних каријесних лезија и остварену задовољавајућу дубину пенетрације (112, 121). Парис и сарадници су у *in vitro* истраживању показали значајно већу пенетрацију ниско вискозне композитне смоле у почетне каријесне лезије глеђи на нивоу јамица и фисура у односу на друге конвенционалне материјале за заливање фисура (72). Слично поменутих резултатима, Прасада и сарадници показали су значајно већу могућност пенетрације инфилтрационе смоле у односу на различита средства за реминерализацију (122). Рана и сар. су такође указали да већу могућност пенетрације инфилтрационе смоле у односу на препарате са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом (са или без флуора) и средства са биоактивним стаклом (калцијум-натријум-фосфосиликат) (27). Још једно истраживање је показало да могућност пенетрације пасте са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом је нижа у односу на инфилтрациону смолу (55). Резултати нашег истраживања су у складу са наведеним налазима у доступној литератури. Композитна смола је на попречном пресеку показала највећу могућност продирања у деминерализоване зоне испод површинског слоја белих мрља. Ипак треба имати у виду и одређена ограничења *in vitro* студија. Успешност примене поменутих средства за реминерализацију зависи и од концентрационог градијента јона калцијума и фосфата, утицаја пљувачке и за постизање пуног ефекта потребно је време. Потребно је у будућим истраживањима потврдити успешност ових препарата и у клиничким условима.

СЕМ анализа је омогућила детаљан увид у морфолошке промене површине глеђи након примене различитих терапијских протокола, при чему су уочене значајне разлике међу испитиваним групама. Неправилна и измењена површина беле мрље, са зонама ерозивних промена, у односу на интактну глеђ потврђује дејство деминерализационог раствора и указује на нарушену површинску микроструктуру глеђи. У односу на морфолошке карактеристике површине беле мрље, након третмана лаком са флуором и пастом са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом уочавају се јасне промене. У групи Ц видљив је равномеран слој који прекрива површину глеђног модела, док присуство калцијум-фосфатних преципитата и одсуство експонираних глеђних призми у групи Д сугеришу ефикасност препарата у стабилизацији површинске структуре и доприносу реминерализацији (123). У групи Е, инфилтрациона техника праћена полирањем резултирала је хомогеном и уједначеном

површином, што може допринети побољшању естетских и функционалних својстава глеђи, као и смањењу пријемчивости за формирање биофилма.

Још један значајан аспект је разматрала група истраживача, а односи се на присуство саливарних протеина и других органских материја у површинском слоју и телу почетне каријесне лезије глеђи. Поставило се питање у којој мери могу утицати на процес нагризања одговарајућом киселином и дубину пенетрације смоле за инфилтарцију (124). Гомез и сар. су испитивали утицај употребу натријум-хипохлорита као средства за елиминацију протеина, пре нагризања површине глеђних модела киселином, али у свом истраживању нису разматрали дубину пенетрације инфилтрационе смоле већ нисковискозног адхезива (125). Подаци из литературе и из клиничке праксе указују да се конвенционално доступна смола за инфилтрацију осим употребе у терапији почетних каријесних лезија глеђи, користи и у терапији моларно-инцизивне хипоминаерализавије (МИХ). С обзиром да је доказан повећан садржај органских материја у глеђи захваћеној МИХ-ом (126), у будућим истраживањима, може се размотрити и примена натријум-хипохлорита за кондиционирање глеђи пре самог протокола за примену инфилтрационе смоле. Његов утицај на дубину пенетрације смоле се може посматрати на попречном пресеку на СЕМ-у.

Поред дифузије резидуалних мономера, метакрилатне смоле су подложне апсорпцији воде, што може довести до хидролизе мономера и кидања естарских веза (127). *In vitro* студија коју су спровели Арслан и сарадници, у којој је упоређиван утицај процеса старења на инфилтрациону смолу, адхезиве и заливаче фисура, при чему су узорци били изложени 10.000 циклуса термоциклирања (еквивалентно једној години старења), показала је да инфилтрациона смола склонија апсорпцији воде у односу на адхезиве и заливаче (128). Наведена појава може се довести у везу са већим уделом хидрофилног мономера TEGDMA у саставу инфилтрационе смоле, што потенцијално може утицати на дуготрајност третмана инфилтрације белих мрља у оралној средини. У оквиру будућих истраживања, може се пратити успешност третмана у клиничким условима и евентуална појава секундарног каријеса. Осим тога, у *in vitro* условима се могу испитивати промене површине глеђи након циклуса термоциклирања и у којој мери детектоване промене утичу на пријемчивост за формирање мономикробног или полимикробног биофилма и промену микротврдоће глеђи.

5.3. Микротврдоћа глеђи

5.3.1. Избора методе мерења тврдоће глеђи

Када се говори о материјалима, тврдоћа се може дефинисати као отпорност одређеног материјала на продирање неког другог, страног тела у његову структуру и кроз његову површину. Осим отпорности на продирање, може се мерити и отпорност на гребање или удубљивање. Представља значајну особину, будући да указује на отпорност на деформације, али је важна и у одређивању отпорности материјала на трошење. Тврђе материје, а тако и различити материјали, углавном имају сложену кристалну структуру.

Основна подела различитих начина мерења микротврдоће је на статичке (притисак се постепено примењује на испитивану површину) и динамичке (примена тзв. брзих оптерећења). Најчешће се примењују Викерсова (индентер у облику четворостране пирамиде), Кнупова (индентер ромбоидног облика), Бринелова (индентер је кугла од челика или карбида), Роквелова метода (постоји више типова индентера). Од динамичких издвајају се Шорова метода и метода по Либу. Посебно се издвајају мерења микротврдоће и нанотврдоће, као савременије методе за прецизна мерења мањих узорака или танких слојева материјала.

Мерења микротврдоће глеђи захтевају да површина која се тестира буде глатка, равна и паралелна са подлогом. Неки аутори су помоћу силикон-карбидних абразивних дискова, уз водено хлађење, вршили заравњавање површине глеђи (112, 114, 129). Истовремено, пријавили су и губитак површинског слоја глеђи од око 100 μm . У овој дисертацији, интегритет површине глеђи је био очуван и нису коришћени наведени абразивни поступци. Стога, мерење микротврдоће методом *Vickers* или *Knoop* није било могуће. Наведени начини одређивања микротврдоће захтевају заравњену површину, паралелну подлози, како би се дијагонале отиска који индентер оставља могле прецизно измерити. Одабрано је динамичко мерење микротврдоће глеђи, помоћу индентера сферног облика и *Oliver Pharr* математичког модела израчунавања вредности. Описани начин мерења микротврдоће глеђи је примењиван и описан у доступној литератури (130, 131).

Oliver Pharr модел је описан 1992. године у циљу израчунавања тврдоће и модула еластичности. Дефинише се као аналитичка метода која се користи у оквиру инструменаталне наноиндентације или микроиндентације (132). У односу на претходно описане начине одређивања тврдоће различитих материјала, суштинска разлика се огледа у анализи криве оптерећења и растерећења током индентације. Параметри који су важни за прецизно мерење су сила утискивања, дубина продирања индентера и еластични повратак након растерећења (Слика 14). Као што је већ наглашено, не анализирају се дијагонале отиска индентера.

5.3.2. Вредности мерења микротврдоће

Мерење тврдоће глеђи може показати да ли је дошло до побољшања механичких карактеристика почетне каријесне лезије глеђи након употребе различитих средстава за реминерализацију или третмана композитном смолом. Ова мерења не могу идентификовати промене у минералном саставу глеђи, али подаци из литературе доказују да успешно одражава промену њених механичких особина (108, 133, 134). У овој дисертацији, уочено је статистички значајно повећање вредности микротврдоће глеђи након инфилтрације белих мрља композитном смолом у односу на нетретирани беле лезије. Најнижа средња вредност измерена је код почетних каријесних лезија глеђи, што је било и очекивано и у складу са подацима из литературе (12, 25, 27). Овакав резултат може се објаснити хемијским променама и ремоделовањем глеђних призми у потповршинском слоју беле мрље, које доводе до ширења интерпризматичних простора и смањења тврдоће ткива (27). Анализа резултата пасте са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом и лака са флуором указује на тренд повећања микротврдоће глеђи, али то повећање није показало статистичку значајност. Имајући у виду све поменуте резултате, радна хипотеза овог дела истраживања се не може у потпуности прихватити.

Органски матрикс композитне смоле је у највећем проценту састављен од триетилен гликол диметакрилата (енгл. TEGDMA). Овај мономер има високи степен конверзије, ниску вискозност и малу молекуларну масу. Још једна од његових добрих особина је могућност продирања у порозну структуру беле мрље и последично попуњавање субповршинских зона деминерализације. На тај начин долази до стварања својеврсне дифузионе баријере, а истовремено се побољшавају механичка својства глеђи. Истраживања Париса и сарадника су такође показала да инфилтрација белих мрља композитном смолом може повећати тврдоћу глеђи (73). Сличне резултате је имала и студија Мандаве и сарадника, који су ову смолу упоређивали са другим материјалима (водена суспензија силицијум-диоксида) (108). Ипак већина њих наводи ниже вредности тврдоће глеђи смолом инфилтрираних белих мрља у односу на здраву глеђ (112, 134), што није у сагласности са резултатима ове дисертације. Те ниже вредности микротврдоће се могу повезати са смањеним степеном конверзије мономера или непотпуном полимеризацијом (129). Такође, недовољно трајање поступка инфилтрације или контракција композитне смоле током полимеризације могу довести до непотпуног продора смоле и неадекватног заптивања порозних структура у почетној каријесној лезији глеђи. Као последица, тврдоћа глеђи неће били приближна вредностима здравог зубног ткива. Бехроузи и сар. имали су другачије закључке у односу на ову дисертацију. У њиховом истраживању инфилтрациона смола је показала значајно мање повећање микротврдоће глеђи у односу на пасту са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом (уз додатак флуора) и препарат на бази хидроксиапатита, флуорида и ксилитола (110).

Примена различитих препарата са флуоридима се често назива „златним стандардом“ у превенцији и профилакси каријеса. Резултати више истраживања то и потврђују (60, 62, 135). Такође, подаци из литературе указују да је висококонцентрирани лак са флуором ефикасан у редукцији каријеса и да обезбеђује дуготрајне резултате без појаве нежељених ефеката (136, 137). Још једна од његових предности је једноставна клиничка примена, што одговара и терапеутима и пацијентима (како деци тако и одраслима). За разлику од лакова, раствори са флуором су економичнија опција, али постоје одређена ограничења у индикацијама. Не могу се примењивати код деце млађе од 6 година или код особа које услед присутне психо-физичке ометености у развоју не могу испратити инструкције током стоматолошке процедуре. У овом истраживању коришћен је лак са органским флуоридима. Иницијална концентрација флуора у фабричком паковању износи 7700 ppm, што је нижа концентрација у односу на конвенционални 5% натријум-флуорид (NaF). Али, према смерницама произвођача, након апликације лака на површину зуба, долази до испаравања растварача и до повећања концентрација флуора (четири пута у односу на почетну вредност). Додатна позитивна особина је што органски флуориди формирају стабилан, танак филм на површини глеђи, захваљујући својој особини сурфактанта, који побољшава ретенцију лака и омогућава дужи антибактеријски ефекат и реминерализацију зубног ткива. Ако се посматра клинички аспект, органски лакови са флуором се постављају у танком слоју који се брзо суши, што је погодно за целокупну педијатријску популацију.

У клиничкој пракси често се примењују и средства са казеин фосфопептидом аморфним калцијумфосфатом, тако да су његова улога и ефикасност предмет различитих истраживања (59, 138). Препоруке засноване на научним доказима указују на позитивне ефекте примене ових препарата. Међутим, према подацима из доступне научне литературе, флуориди и даље имају ширу клиничку примену (139).

Ово истраживање показало је приближне средње вредности тврдоће gleђи након примене лака са флуором и пасте са казеин фосфопептидом аморфним калцијумфосфатом. Ове вредности су ниже од тврдоће здраве gleђи и смолом инфилтрираних белих мрља, али су више од измерених вредности тврдоће почетних каријесних лезија gleђи. Третман нисковискозном композитном смолом се спроводи у једној посети, тако да се одмах након инфилтрације могу детектовати промене у тврдоћи gleђи. Механизам деловања препарата са флуором (у овом случају висококонтрованог лака) и пасте са казеин фосфопептидом аморфним калцијумфосфатом је другачији и сама динамика овог процеса захтева дужи временски период како би се показали резултати. У овој дисертацији, паста је апликована свакодневно током 4 недеље (28 дана) (140-142), док су узорци третирани лаком са флуором током овог периода били складиштени. У даљим истраживањима може се размотрити продужена примена пасте са казеин фосфопептидом аморфним калцијумфосфатом и поређење резултата са резултатима ове студије. Упркос одређеним ограничењима *in vitro* истраживања, примена лака са флуором и пасте са казеин фосфопептидом аморфним калцијумфосфатом је показала позитиван терапијски ефекат и тенденцију повећања вредности микротврдоће gleђи у односу на почетну каријесну лезију gleђи. Добијени резултати су били у складу са налазима у литератури (142).

Као што је већ наглашено, *in vitro* студије се често користе за испитивање различитих особина gleђи, укључујући тврдоћу, хрупавост површине, пријемчивост за формирање биофилма. Усна дупља је динамична средина у којој се непрекидно одвијају процеси деминерализације и реминерализације на површини зуба. Такође, пљувачка испољава своје механичке и хемијске заштитне ефекте. Описане услове није једноставно испратити у експерименталном истраживању, тако да треба размотрити то као једно од ограничења овог истраживања. Развој каријеса је сложен процес који је све до појаве кавитета реверзибилан (140). Микротврдоћа јесте важан показатељ терапијског успеха, али није једини, посебно када се говори о средствима са флуором и калцијумфосфатом. Ова средства могу довести до заустављања каријеса и минерализације површине gleђи која је чини отпорнијом на даљи процес деминерализације, а да при томе промена у вредности микротврдоће није још увек значајна. Тако да, промене у минералном саставу (помоћу *SEM/EDX*) и отпорност овако третиране површине gleђи на промене рН вредности могу бити тема будућих истраживања.

5.4. Пријемчивост за формирање биофилма

5.4.1. Пријемчивост за формирање биофилма *Streptococcus mutans*

У овом истраживању испитиван је утицај различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија gleђи на пријемчивост за формирање мономикробног биофилма (*Streptococcus mutans*). Резултати квантификације бактерије по милилитру узорка у оквиру ове дисертације су показали статистички значајну разлику међу испитиваним групама, тако да је радна хипотеза овог дела истраживања прихваћена. Површина интактне gleђи и површина беле мрље нису показале значајну разлику у пријемчивости за *Streptococcus mutans*. У истраживању Азизнезхада и сар. је такође показано да нема статистички значајне разлике у адхезији *S. mutans*

за површину интактне глеђи и почетне каријесне лезије глеђи (60). Пођо и сар. су испитивали утицај површинске морфологије различитих материјала на адхезију *S. Mutans*. Резултати њиховог истраживања указују да површинска храпавост не утиче значајно за адхезију поменутих бактерије. Карактеристике које су навели као значајније су електростатичке особине површине и њена хидрофобност (143). Са друге стране неки истраживачи су навели очекивано повећање пријемчивости за површину беле мрље с обзиром на могуће појаве порозитета на површини након процеса формирања белих мрља у *in vitro* условима (144).

Што се тиче инфилтрационе композитне смоле, Солеј и сар. су утврдили да осим повољног утицаја на микротврдоћу глеђи, може довести до смањења адхезије бактерија на инфилтритрану површину зуба (144). Резултати овог истраживања, који су у складу са претходно наведеним подацима из литературе, указују да бела мрља након третмана композитном смолом није била пријемчива за ову бактерију. Број формираних бактеријских колонија је био сличан као и након третмана казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом, нешто мањи у односу на интактну глеђ и површину беле мрље, али без статистички значајне разлике. Повољан утицај након поступка инфилтрације може се објаснити чињеницом да нисковискозна композитна смола испуњава микропорозитете на површини глеђи, а након полирања површина је глатка и пријемчивост за формирање биофилма је снижена.

Резултати квантификације *S. mutans* након третмана беле мрље лаком са флуором нису у складу са налазима у литератури. У нашем истраживању ова тест група показала је највише вредности створених бактеријских колонија. Чау и сар. су у спроведеној студији указали да примена лака са флуором статистички значајно смањује пријемчивост ове бактерије (145). Сличне резултате имала је и *in vitro* студија у којој је упоређиван утицај лака са флуором, инфилтрационе смоле и пасте са нанохидроксиапатитом на адхезију *S. mutans* (60). Арслан и сар. су утврдили да након инфилтрације, површина беле мрље је мање пријемчива за мономикробни биофилм (*S. Mutans*), а да лак са флуором значајно смањује ту пријемчивост (144).

Метода ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *qPCR*) се често користи за квантификацију различитих микроорганизама (146, 147). У односу на конвенционално пребројавање формираних колонија, ова метода има већу сензитивност, односно може детектовати ниске нивое циљане ДНК чак и код присуства малог броја микроорганизама.

Као и код пребројавања формираних колонија *Streptococcus mutans*, метода ланчане реакције полимеразе у реалном времену је показала значајну разлику међу испитиваним групама, тако да је радна хипотеза овог дела истраживања прихваћена. Анализирајући податке квантификације ове бактерије из литературе, овај резултат показује одређена одступања. У литератури има навода да разлика у храпавости и морфологији површине глеђи и различитих материјала утиче на адхезију бактерија (144). Међутим, налази Пођа и сарадника указују да морфологија површине не утиче значајно на пријемчивост за поменуту бактерију (143). Овај начин квантификације бактерије није показао значајну разлику између површине интактне глеђи и беле мрље, што је у сагласности са налазима претходно поменутог аутора. Површина беле мрље третирана пастом са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом је показала значајно мању пријемчивост за формирање биофилма у односу на површину беле мрље и у односу на инфилтрацију композитном смолом. Наведени налази потврђује резултате истраживања различитих аутора о позитивном терапијском утицају средстава на бази калцијум фосфата (148, 149). Примена лака са флуором у третману беле мрље је значајно умањила формирање биофилма у односу на нетретирану белу

мрљу, што није у сагласју са резултатима добијеним пребројавањем колонија. Антибактерисјки ефекат препарата са флуоридима је потврђен различитим истраживањима (145, 150). Имајући у виду да метода ланчане реакције полимеразе у реалном времену има већу сензитивност у односу на други начин квантификације коришћен у оквиру ове дисертације, може се сматрати да су резултати добијени qPCR методом клинички релевантнији. Површина беле мрље инфилтрирана нисковискозном композитном смолом показала је већу пријемчивост за испитивани мономикробни биофилм. Хахнел и сарадници су указали да састав композитних материјала и присуство одређених мономера могу утицати на адхезију *S. Mutans* (83), што може бити предмет будућих истраживања. Након третмана нисковискозном композитном смолом, може се профилактички применити висококонцентровани препарат са флуором или се може препоручити примена пасте са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом у кућним условима. У литератури, када се говори о испитиваним препаратима, преобладајуће је вршена квантификација бактерије пребројавањем по милилитру узорка. Оскудан је налаз примене qPCR методе у овој конкретној ситуацији. Услед варијабилности података, уочава се потреба за даљим испитивањем.

Скенинг електронска микроскопија је послужила за визуелни приказ формираног биофилма у испитиваним групама. Уочен је сферичаст облик бактерије *Streptococcus mutans*, које су повезане у краће или дуже ланце у зависности од количине формираног биофилма (151). Сама површина бактерија може бити релативно глатка или благо неравна, зрнаста што указује на продукцију екстраћелијских полисахарида. Екстраћелијски полисахариди представљају важну компоненту биофилма, доприносећи адхезији бактерија за подлогу, њиховој међусобном повезивању и укупној структурној стабилности биофилма (152). На интактној површини глеђи уочено је присуство спорадичних бактеријских ланаца. У групи Б, на површини белих мрља, на мањем увећању не могу се јасно уочити ове структуре. Разлог може бити ирегуларни изглед површине са фокалном деминерализацијом и лакунама, које могу отежавати визуелизацију формираних ланаца. На већем увећању уочава се повезаност бактерија густом, лепљивом масом, што одговара повезивању бактерија и присуству екстраћелијских полисахарида (153). Овакав налаз одговара подацима у доступној литератури. Анализа површине глеђи у групи Д показује малу концентрацију ланаца, који су насумично распоређени без уређене структуре. Ово одговара и резултатима квантификације и ниским вредностима како пребројавања колонија тако и qPCR методе. Налаз у групи Е је показао упоредиве резултате. СЕМ анализа површине беле мрље третиране лаком са флуором одговара резултатима квантификације пребројавањем колонија. Уочава се мноштво ланаца који су међусобно повезани и уроњени у неравномерни слој лака. Овакав налаз није у складу са подацима из литературе у којима је лак са флуором довео до смањене пријемчивости и адхезије *Streptococcus mutans* (144, 145).

Постоје одређена ограничења *in vitro* студија, као и немогућност прецизне репродукције оралног окружења и услова који ту владају. У будућим истраживањима било би корисно комбиновати *in vitro* и *in vivo* студије у циљу прецизнијег дефинисања утицаја различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи. Такође, користан додатак би било и *in silico* истраживање са поређењем сложених метаболичких путева и интеракција које се одвијају у полимикробном биофилму.

5.4.2. Пријемчивост за формирање биофилма *Candida albicans*

Спроведена клиничка истраживања показала су повезаност *Candida albicans* и каријеса раног детињства (154, 155). Резултати једне студије указују да деца у чијој усној дупљи је потврђено присуство поменуте гљивице имају пет пута већи ризик за каријеса раног детињства (156). Такође, истраживања на животињским моделима су имала сличне резултате, закључујући да удружено дејство *S. mutans* и *C. albicans* доводи до развоја каријеса и његових компликација (87). Осим поменуте улоге у развоју каријеса раног детињства, истраживања су доводила у везу микробиолошке интеракције *C. albicans* и бактерија врста *Actinomyces* и *Fusobacterium* са различитим патолошким процесима у усној дупљи и развојем оралних обољења (157, 158). Ду и сарадници су показали значајну улогу *C. albicans* и каријеса корена зуба услед изазивања микробиолошке дисбиозе и стварања услова за развој зрелог кариогеног биофилма (82).

У доступној научној литератури нема значајних података о утицају испитиваних средстава на пријемчивост за формирање мономикробног биофилма *C. albicans*. Резултати квантификације *C. albicans* су показале нешто другачије вредности у односу на број формираних колонија *S. mutans*. Највећи број формираних колонија *C. albicans* уочен је на површини инфилтриране беле мрље. Овај број је значајно већи у односу на интактну глеђ, површину беле мрље након третмана лаком са флуором и након третмана пастом са казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом. Такође, у односу на резултате квантификације бактерије, овде је показан значајна разлика у пријемчивости интактне површине глеђи и површине беле мрље. То се може објаснити афинитетом *C. albicans* према ирегуларној површини беле мрље са зонама изражене деминерализације. Када се посматрају три испитивана третмана беле мрље, уочава се значајна разлика у пријемчивости за формирање биофилма, односно инфилтрациона смола је, према нашим резултатима, пријемчивија за *C. albicans* у односу на лак са флуором и пастом са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом. На основу анализе добијених резултата, радна хипотеза овог дела истраживања се прихвата.

Моуса и сар. истичу да су подаци о утицају препарата са флуором на *C. albicans* у доступној литератури оскудни и уочавају потребу за истраживањем ове теме (159). Закључили су да и *C. albicans* и гљивице које припадају другој врсти могу стварати киселе продукте у аеробним и у анаеробним условима. Посебно занимљив налаз, с аспекта превенције и терапије каријеса, представља њихова отпорност на дејство флуорида. Сами механизми резистенције су неразјашњени што отвара питања за нове студије. У нашем истраживању површина беле мрље третирана лаком са флуором није се показала пријемчивом за *C. albicans*.

Код квантификације *C. albicans* методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену, показало се да је највећа концентрација овог микроорганизма присутна након примене инфилтрационе смоле. Ова разлика је статистички значајно већа у односу на преостале четири групе. Међутим у односу на квантификацију пребројавањем формираних колонија, резултати qPCR методе нису показали значајне разлике код интактне глеђи, површине беле мрље, као и беле мрље третиране лаком са флуором и пастом са казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом. Радна хипотеза постављена на почетку истраживања за квантификацију *C. albicans* методом ланчане реакције полимеразе у реалном времену је прихваћена.

Налази из литературе показују да се инфилтрација нисковискозном композитном смолом примењује у терапији белих мрља, како на вестибуларним, тако и на апроксималним површинама зуба (77, 160). У последњих неколико година, примена овог микроинвазивног концепта код моларно-инцизивне хипоминаерализације такође је све чешћи предмет истраживања (161). Резултати ове дисертације указали су на повећану пријемчивост инфилтриране површине глеђи за формирање биофилма *C. albicans*. Стога, потребно је овај налаз додатно испитати у клиничким условима. На основу остварених резултата, могле би се формирати препоруке за примену средстава која смањују адхезију *C. albicans* након поступка инфилтрације.

На СЕМ-у *C. albicans* показује специфичан изглед. Могу се уочити појединачне округле или благо издужене (елипсоиде) ћелије (бластоспоре). У неким случајевима могу израсти у хифе или псеудохифе које изгледају као издужене формације, са евентуалним сужењима на спојевима и подсећају на филаментне структуре. У зависности од вирулентности и зрелости биофилма, могу се уочити у знаци пупљења на зидовима бластоспора (162, 163). На интактној површини глеђи уочавају се округле и елипсоидне структуре, у неким деловима и филаментозне структуре (164). На појединим бластоспорама запажени су знаци пупљења. На белој мрљи уочава се сличан налаз, али знатно гушће постављен, што одговара резултатима пребројавања формираних колонија. Занимљив је налаз након третирања лаком са флуором. Уочавају се местимично распоређене бластоспоре, без филаментозних творевина, што указује да лак није био пријемчив за *C. albicans*. Густо концентроване бластоспоре, прожете филаментозним структурама које прекривају целокупну површину глеђи су уочене након инфилтрације композитном смолом. Насупрот лаку са флуором, композитна смола је показала пријемчивост за формирање биофилма *C. albicans*. Према нашим сазнањима, у доступној литератури нема значајних података о утицају ових средстава која се користе у терапији белих мрља на формирање поменутог биофилма. Наредни корак у истраживању, значајан за разумевање утицаја ових микроорганизама, био би испитивање дуалног модела биофилма и различитих третмана почетних каријесних лезија глеђи.

Будући да су резултати микробиолошког испитивања неусаглашени, у будућим истраживањима може се вршити квантификација мономикробних, али и полимикробног биофилма (*Streptococcus mutans* и *Candida albicans*) и процена утицаја различитих третмана почетних каријесних лезија глеђи. Ово би додатно показало колика је ефикасност различитих третмана и пружило смернице за примену у клиничкој пракси.

5.5. Утицај третмана белих мрља на ћелије хумане гингиве

5.5.1. Митохондријална активности (МТТ)

Будући да се средства за реминерализацију глеђи, као и нисковискозне композитне смоле, апликују на површину зуба и да могу доћи у директан контакт са оралним ткивима, неопходно је да буду у биолошком складу са њима (106). Током примене, наведена средства могу остварити контакт са гингивом, услед чега може доћи до развоја инфламаторних процеса, појаве алергијских реакција или испољавања цитотоксичног дејства. Доказана је чињеница да ослобађање

резидуалних, неполимеризованих мономера из различитих композитних материјала може неповољно утицати на ћелије, како пулпне, тако и оралне мукозе. Самуелсен и сар. су утврдили да излагање током 24 сата ниским концентрацијама TEGDMA (0,5 mM) може довести до оштећења и смрти ћелија (165). Такође, Батареш и сар. су показали да излагање хуманих фибробласта пулпе истом мономеру (0,25 mM) доводи до значајног повећања концентрације проапоптотских протеина (као што су цитохром ц, каспаза 3) (166). Стога, могуће је ослобађање резидуалних мономера у случају непотпуног процеса полимеризације инфилтрационе композитне смоле који ће доћи у непосредан контакт са меким ткивима усне дупље. Према упутству произвођача, инфилтрациона смола се може користити за лезије локализоване у глеђи и спољашњој трећини дентина. Тако да, уколико се процени да се ради о лезијама које захватају и дентин, треба имати у виду потенцијалне последице на ћелије пулпе (167, 168).

У литератури су доступни подаци о степену ослобађања резидуалних мономера из инфилтрационе композитне смоле у односу на различите композитне материјале који се користе у клиничкој пракси. Резултати истраживања показују да је степен ослобађања мономера низак, али да се може додатно смањити адекватним полирањем након инфилтрације белих мрља (169). У протоколу за примену инфилтрационе смоле (*ICON*, *DMG*, Хамбург, Немачка) у оквиру ове дисертације предвиђен је и поступак полирања.

Упркос бројним истраживањима потенцијалне цитотоксичности различитих препарата са флуоридима, који се примењују у превентивне и профилактичке сврхе, налази из литературе указују на потребу за додатним истраживањима лакова са флуором (170). Разлог лежи у чињеници да су неки од доступних препарата показали неповољан утицај на ћелије хумане гингиве. Сесхадри и сар. су закључили да са повећањем концентрације флуора (од 0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1 и 1 % NaF) опада вијабилност гингивалних фибробласта (170). У истраживањима су поменути одређени састојци комерцијално доступних лакова са флуором, као што су етил ацетат и цетилпиридинијум хлорид, који могу испољити цитотоксичне ефекте на ћелије и допринети развоју бактеријске резистенције (171). Занимљива је и студија групе истраживача из Шпаније која је испитивала утицај пасти за зубе на хумане гингивалне фибробласте. Закључили су да флуориди у пастама за зубе немају негативан утицај на вијабилност фибробласта (172). Они наглашавају потребу за даљим испитивањем других састојака пасти као што су конзерванси и сурфактанти (нпр. натријум лаурил сулфат). Такође, било би пожељно у будућим истраживањима проширити број испитиваних средстава и посматрати понашање хуманих гингивалних фибробласта при различитим концентрацијама флуора.

Резултати дисертације указују да испитивана средства нису у значајној мери смањила вијабилност хуманих гингивалних фибробласта. Радна хипотеза постављена на почетку за овај део истраживања није прихваћена. У поређењу са контролном групом (интактна глеђ, 100% вијабилност) третман лаком са флуором није угрозио гингивалне фибробласте, већ се може рећи да је имао пролиферативни ефекат (средња вредност вијабилности 126,21%). Казеин фосфопептид аморфни калцијум фосфат је показао упоредиве резултате, није дошло до смањене вијабилности ћелија. Овај налаз је конзистентан са описаним сазнањима у литератури (173). Једино је у групи Е, где је бела мрља инфилтрирана композитном смолом, дошло до смањења процента вијабилности, али без статистички значајне разлике у односу на контролну групу. Ово се може довести у везу са ослобађањем неполимеризованих мономера. Тако да, у клиничким

условима неопходно је обезбедити адекватне услове за полимеризацију и након завршеног третмана, извршити полирање инфилтриране површине глеђи.

5.5.2. Адхезија фибробласта за површину глеђи (СЕМ анализа)

СЕМ анализа је омогућила визуелни приказ хуманих фибробласта гингиве адхерираних на површину глеђних препарата. Више карактеристика површине може утицати на адхезију и пролиферацију ћелија, као што су њена морфологија, храпавост, хидрофилност (174). На препаратима глеђи у овом истраживању, фибробласти изгледају као полигоналне ћелије са мање или више израженим цитоплазматским продужецима. Ови налази одговарају и подацима из литературе (100). На глеђном моделу у групи А (интактна глеђ) може се видети мрежаста распоред међусобно повезаних фибробласта, док је на површини беле мрље мање изражена њихова мрежаста организација. Неки аутори су показали негативан утицај флуора, посебно високих концентрација, на фибробласте, о чему је било речи у претходном поглављу (170). СЕМ анализа у оквиру ове дисертације је показала успешну адхеренцију фибробласта гингиве на површину беле мрље третиране лаком са флуором. Доступни литературни подаци указују на ограничен број истраживања која се баве СЕМ приказом фибробласта гингиве на површинама третираним казеин фосфопептидом аморфним калцијум фосфатом и инфилтрационом смолом.

6. ЗАКЉУЧАК

Према постављеним циљевима и резултатима ове дисертације, могу се извести следећи закључци:

1. Раствор за формирање артифицијелних белих мрља састављен од калцијум хлорида, монокалијум фосфата и сирћетне киселине одговарајућих концентрација, са рН вредношћу 4,4 и дужином излагања од 96 сати је довео до формирања белих мрља одговарајућих особина.

2. Инфилтрација почетних каријесних лезија глеђи (белих мрља) нисковискозном композитном смолом значајно повећава микротврдоћу глеђи у односу на вредности микротврдоће белих мрља.

3. Третмани белих мрља лаком са флуором и пастом са казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом су показали упоредиве вредности микротврдоће глеђи, али није дошло до статистички значајног повећања вредности микротврдоће у односу на беле мрље.

4. Беле мрље третиране лаком са флуором су показале највећу пријемчивост за формирање биофилма *Streptococcus mutans* (бројањем колонија по милилитру узорка – CFU/ml).

5. Површина почетних каријесних лезија глеђи третирана пастом са казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом је била најмање пријемчива за формирање биофилма *Streptococcus mutans*.

6. Беле мрље инфилтриране нисковискозном композитном смолом су испољиле највећу пријемчивост за формирање биофилма *Candida albicans*.

7. Испитивана средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија глеђи (лак са флуором, паста са казеин фосфопептидом-аморфним калцијум фосфатом и нисковискозна инфилтрациона смола) нису неповољно утицала на вијабилност ћелија хумане гингиве (фибробласти).

8. Третман лаком са флуором је резултирао највећим проценатом вијабилности фибробласта гингиве.

9. Скенинг електронска микроскопија је потврдила адхезију фибробласта гингиве у свим испитиваним групама.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res.* 2017;96(4):380-7.
2. Petersen P, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION.* 2005;83(9):661-9.
3. Peric T, Campus G, Markovic E, Petrovic B, Soldatovic I, Vukovic A, et al. Oral Health in 12- and 15-Year-Old Children in Serbia: A National Pathfinder Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(19).
4. Chimbinha Í, Ferreira BNC, Miranda GP, Guedes RS. Oral-health-related quality of life in adolescents: umbrella review. *BMC Public Health.* 2023;23(1):1603.
5. Abdullah A, König HH, Hajek A. Oral health-related quality of life and loneliness: results based on a cross-sectional survey. *Arch Public Health.* 2024;82(1):114.
6. Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD. Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J.* 2021;231(12):749-53.
7. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers.* 2017;3:1-16.
8. Partridge EE, Mayer-Davis EJ, Sacco RL, Balch AJ. Creating a 21st century global health agenda: the general assembly of the United Nations High Level Meeting on Non-Communicable Diseases. *Diabetes Care.* 2011;34(6):1440-1.
9. Lamster IB. The 2021 WHO Resolution on Oral Health. *Int Dent J.* 2021;71(4):279-80.
10. Spatafora G, Li Y, He X, Cowan A, Tanner ACR. The Evolving Microbiome of Dental Caries. *Microorganisms.* 2024;12(1).
11. Liu R, Liu Y, Yi J, Fang Y, Guo Q, Cheng L, et al. Imbalance of oral microbiome homeostasis: the relationship between microbiota and the occurrence of dental caries. *BMC Microbiol.* 2025;25(1):46.
12. Innes NPT, Chu CH, Fontana M, Lo ECM, Thomson WM, Uribe S, et al. A Century of Change towards Prevention and Minimal Intervention in Cariology. *J Dent Res.* 2019;98(6):611-7.
13. El Tantawi M, Folyan MO, Mehaina M, Vukovic A, Castillo JL, Gaffar BO, et al. Prevalence and Data Availability of Early Childhood Caries in 193 United Nations Countries, 2007-2017. *Am J Public Health.* 2018;108(8):1066-72.
14. Markovic D, Soldatovic I, Vukovic R, Peric T, Campus G, Vukovic A. How Much Country Economy Influences ECC Profile in Serbian Children-A Macro-Level Factor Analysis. *FRONTIERS IN PUBLIC HEALTH.* 2019;7.
15. Staines M, Robinson W, Hood J. Spherical indentation of tooth enamel. *Journal of materials science.* 1981;16(9):2551-6.
16. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res.* 2000;14:40-7.
17. Ekstrand KR, Ricketts DN, Kidd EA. Reproducibility and accuracy of three methods for assessment of demineralization depth of the occlusal surface: an in vitro examination. *Caries Res.* 1997;31(3):224-31.
18. Hicks MJ, Silverstone LM. Internal morphology of surface zones from acid-etched caries-like lesions: a scanning electron microscopic study. *J Dent Res.* 1985;64(11):1296-301.
19. Silverstone LM. Remineralization phenomena. *Caries Res.* 1977;11 Suppl 1:59-84.
20. Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C35-8.
21. Sadyrin E, Swain M, Mitrin B, Rzhepakovsky I, Nikolaev A, Irkha V, et al. Characterization of Enamel and Dentine about a White Spot Lesion: Mechanical Properties, Mineral Density, Microstructure and Molecular Composition. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(9).
22. Das Gupta S, Killenberger M, Tanner T, Rieppo L, Saarakkala S, Heikkilä J, et al. Mineralization of dental tissues and caries lesions detailed with Raman microspectroscopic imaging. *ANALYST.* 2021;146(5):1705-13.

23. Theodory TG, Kolker JL, Vargas MA, Maia RR, Dawson DV. Masking and Penetration Ability of Various Sealants and ICON in Artificial Initial Caries Lesions In Vitro. *Journal of Adhesive Dentistry*. 2019;21(3):265-72.
24. Bandekar S, Patil S, Dudulwar D, Moogi PP, Ghosh S, Kshirsagar S. Remineralization potential of fluoride, amorphous calcium phosphate-casein phosphopeptide, and combination of hydroxylapatite and fluoride on enamel lesions: An. *J Conserv Dent*. 2019;22(3):305-9.
25. Soveral M, Machado V, Botelho J, Mendes JJ, Manso C. Effect of Resin Infiltration on Enamel: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Funct Biomater*. 2021;12(3).
26. Sundararaj D, Venkatachalapathy S, Tandon A, Pereira A. Critical evaluation of incidence and prevalence of white spot lesions during fixed orthodontic appliance treatment: A meta-analysis. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(6):433-9.
27. Rana N, Singh N, Shaila, Thomas AM, Jairath R. A comparative evaluation of penetration depth and surface microhardness of Resin Infiltrant, CPP-ACPF and Novamin on enamel demineralization after banding: an. *Biomater Investig Dent*. 2021;8(1):64-71.
28. Salerno C, Grazia Cagetti M, Cirio S, Esteves-Oliveira M, Wierichs RJ, Kloukos D, et al. Distribution of initial caries lesions in relation to fixed orthodontic therapy. A systematic review and meta-analysis. *Eur J Orthod*. 2024;46(2).
29. Willmot DR. White lesions after orthodontic treatment: does low fluoride make a difference? *J Orthod*. 2004;31(3):235-42; discussion 02.
30. Lee JH, Kim DG, Park CJ, Cho LR. Minimally invasive treatment for esthetic enhancement of white spot lesion in adjacent tooth. *J Adv Prosthodont*. 2013;5(3):359-63.
31. Perdigão J. Resin infiltration of enamel white spot lesions: An ultramorphological analysis. *J Esthet Restor Dent*. 2020;32(3):317-24.
32. Nayak UA, Pawar A, Kappadi D, Prajapati D, Roy KJ, Wadhwa S. Visible Enamel Defects in Adolescents: How Do their Peers View Them? *Int J Clin Pediatr Dent*. 2018;11(6):479-82.
33. Nayak UA, Kailani T, Althagafy R. Microinvasive, Esthetic Management of White Spot Lesion following Orthodontic Treatment Using Resin Infiltration: A Case Report. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2023;16(2):396-9.
34. Benson PE, Javidi H, DiBiase AT. What is the value of orthodontic treatment? *Br Dent J*. 2015;218(3):185-90.
35. Hasmun N, Vettore MV, Lawson JA, Elcock C, Zaitoun H, Rodd HD. Determinants of children's oral health-related quality of life following aesthetic treatment of enamel opacities. *J Dent*. 2020;98:103372.
36. Featherstone JD, Doméjean S. The role of remineralizing and anticaries agents in caries management. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):28-31.
37. Eidt G, Waltermann EDM, Hilgert JB, Arthur RA. Candida and dental caries in children, adolescents and adults: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol*. 2020;119:104876.
38. Aref NS, Alrasheed MK. Casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate and universal adhesive resin as a complementary approach for management of white spot lesions: an in-vitro study. *Progress in Orthodontics*. 2022;23(1):12.
39. Pinar Erdem A, Sepet E, Kulekci G, Trosola SC, Guven Y. Effects of two fluoride varnishes and one fluoride/chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation in vitro. *Int J Med Sci*. 2012;9(2):129-36.
40. Van Loveren C. Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. *Caries Res*. 2001;35 Suppl 1:65-70.
41. Oliveira PRA, Barboza CM, Barreto LSDC, Tostes MA. Effect of CPP-ACP on remineralization of artificial caries-like lesion: an in situ study. *Braz Oral Res*. 2020;34:e061.
42. Sebastian R, Paul ST, Azher U, Reddy D. Comparison of Remineralization Potential of Casein Phosphopeptide: Amorphous Calcium Phosphate, Nano-hydroxyapatite and Calcium Sucrose Phosphate on Artificial Enamel Lesions: An. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2022;15(1):69-73.

43. Almansouri N, Bakry AS, Abbassy MA, Linjawi AI, Hassan AH. Evaluation of Resin Infiltration, Fluoride and the Biomimetic Mineralization of CPP-ACP in Protecting Enamel after Orthodontic Inter-Proximal Enamel Reduction. *Biomimetics (Basel)*. 2023;8(1).
44. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;2003(1):CD002278.
45. Arnold WH, Dorow A, Langenhorst S, Gintner Z, Bánóczy J, Gaengler P. Effect of fluoride toothpastes on enamel demineralization. *BMC Oral Health*. 2006;6:8.
46. Peckham S, Awofeso N. Water fluoridation: a critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:293019.
47. Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Med Acad*. 2013;42(2):179-88.
48. Bruun C, Givskov H. Calcium fluoride formation in enamel from semi- or low-concentrated F agents in vitro. *Caries Res*. 1993;27(2):96-9.
49. Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2(3):283-96.
50. Oliveira B, Salazar M, Carvalho D, Falcao A, Campos K, Nadanovsky P. Biannual Fluoride Varnish Applications and Caries Incidence in Preschoolers: A 24-month Follow-Up Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *CARIES RESEARCH*. 2014;48(3):228-36.
51. Rozier RG, Adair S, Graham F, Iafolla T, Kingman A, Kohn W, et al. Evidence-based clinical recommendations on the prescription of dietary fluoride supplements for caries prevention: a report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc*. 2010;141(12):1480-9.
52. Weyant R. Topical Fluoride for Caries Prevention: Executive Summary of the Updated Clinical Recommendations and Supporting Systematic Review (vol 144, pg 1279, 2013). *JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION*. 2013;144(12):1335-.
53. Babanouri N, Sahmeddini S, Khadang S, Bazargani A. Effect of Xylitol and Fluoride Varnish on Biofilm and Saliva in Orthodontic Patients: A Triple-Blind Randomized Clinical Trial. *Clin Exp Dent Res*. 2025;11(1):e70062.
54. Sonesson M, Twetman S. Prevention of white spot lesions with fluoride varnish during orthodontic treatment with fixed appliances: a systematic review. *Eur J Orthod*. 2023;45(5):485-90.
55. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, et al. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res*. 2008;87(4):344-8.
56. Cross KJ, Huq NL, Reynolds EC. Casein phosphopeptides in oral health--chemistry and clinical applications. *Curr Pharm Des*. 2007;13(8):793-800.
57. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res*. 2003;82(3):206-11.
58. Cai F, Manton DJ, Shen P, Walker GD, Cross KJ, Yuan Y, et al. Effect of addition of citric acid and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate to a sugar-free chewing gum on enamel remineralization in situ. *Caries Res*. 2007;41(5):377-83.
59. Indrapriyadharshini K, Madan Kumar PD, Sharma K, Iyer K. Remineralizing potential of CPP-ACP in white spot lesions - A systematic review. *Indian J Dent Res*. 2018;29(4):487-96.
60. Aziznezhad M, Alaghemand H, Shahande Z, Pasdar N, Bijani A, Eslami A, et al. Comparison of the effect of resin infiltrant, fluoride varnish, and nano-hydroxy apatite paste on surface hardness and. *Electron Physician*. 2017;9(3):3934-42.
61. Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):41-7.
62. Marinho VC. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(3):183-91.
63. Davila JM, Buonocore MG, Greeley CB, Provenza DV. Adhesive penetration in human artificial and natural white spots. *J Dent Res*. 1975;54(5):999-1008.

64. Robinson C, Hallsworth AS, Weatherell JA, Künzel W. Arrest and control of carious lesions: a study based on preliminary experiments with resorcinol-formaldehyde resin. *J Dent Res.* 1976;55(5):812-8.
65. Mueller J, Meyer-Lueckel H, Paris S, Hopfenmuller W, Kielbassa AM. Inhibition of lesion progression by the penetration of resins in vitro: influence of the application procedure. *Oper Dent.* 2006;31(3):338-45.
66. Robinson C, Brookes SJ, Kirkham J, Wood SR, Shore RC. In vitro studies of the penetration of adhesive resins into artificial caries-like lesions. *Caries Research.* 2001;35(2):136-41.
67. Robinson C, Brookes SJ, Kirkham J, Wood SR, Shore RC. In vitro studies of the penetration of adhesive resins into artificial caries-like lesions. *Caries Res.* 2001;35(2):136-41.
68. Meyer-Lueckel H, Paris S, Mueller J, Cölfen H, Kielbassa AM. Influence of the application time on the penetration of different dental adhesives and a fissure sealant into artificial subsurface lesions in bovine enamel. *Dent Mater.* 2006;22(1):22-8.
69. Paris S, Meyer-Lueckel H, Cölfen H, Kielbassa AM. Resin infiltration of artificial enamel caries lesions with experimental light curing resins. *Dent Mater J.* 2007;26(4):582-8.
70. Ibrahim DFA, Venkiteswaran A, Hasmun NN. The Penetration Depth of Resin Infiltration Into Enamel: A Systematic Review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2023;13(3):194-207.
71. Paris S, Meyer-Lueckel H. Inhibition of Caries Progression by Resin Infiltration in situ. *Caries Research.* 2010;44(1):47-54.
72. Paris S, Lausch J, Selje T, Dörfer CE, Meyer-Lueckel H. Comparison of sealant and infiltrant penetration into pit and fissure caries lesions in vitro. *J Dent.* 2014;42(4):432-8.
73. Paris S, Schwendicke F, Seddig S, Muller WD, Dorfer C, Meyer-Lueckel H. Micro-hardness and mineral loss of enamel lesions after infiltration with various resins: Influence of infiltrant composition and application frequency in vitro. *Journal of Dentistry.* 2013;41(6):543-8.
74. Torres CRG, Borges AB, Torres LMS, Gomes IS, de Oliveira RS. Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on the colour masking of white spot lesions. *Journal of Dentistry.* 2011;39(3):202-7.
75. Wierichs RJ, Langer F, Kobbe C, Abou-Ayash B, Esteves-Oliveira M, Wolf M, et al. Aesthetic caries infiltration - Long-term masking efficacy after 6 years. *J Dent.* 2023;132:104474.
76. Kashash Y, Hein S, Göstemeyer G, Aslanalp P, Weyland MI, Bartzela T. Resin infiltration versus fluoride varnish for visual improvement of white spot lesions during multibracket treatment. A randomized-controlled clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2024;28(6):308.
77. Kosiń K, Kiwior J, Polak A, Malina M, Liszka W. ICON infiltration technique as a modern approach to noninvasive caries treatment - A review of the 2018-2024 literature. *Wiad Lek.* 2025;78(12):2757-62.
78. Al Mamoori R, Al Haidar A. Esthetic Improvements of Various Degrees of White Spot Lesion Using Resin Infiltration and Micro-Abrasion (An In Vitro Study). *Journal of Research in Medical and Dental Science.* 2022;10(1):27-33.
79. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7-14.
80. Inchingolo AD, Malcangi G, Semjonova A, Inchingolo AM, Patano A, Coloccia G, et al. Oralbiotica/Oralbiotics: The Impact of Oral Microbiota on Dental Health and Demineralization: A Systematic Review of the Literature. *Children (Basel).* 2022;9(7).
81. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of. *Microbiol Spectr.* 2019;7(1).
82. Du Q, Ren B, He J, Peng X, Guo Q, Zheng L, et al. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. *ISME J.* 2021;15(3):894-908.
83. Hahnel S, Rosentritt M, Bürgers R, Handel G. Surface properties and in vitro *Streptococcus mutans* adhesion to dental resin polymers. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(7):2619-27.

84. Liu Y, Daniel SG, Kim HE, Koo H, Korostoff J, Teles F, et al. Addition of cariogenic pathogens to complex oral microflora drives significant changes in biofilm compositions and functionalities. *Microbiome*. 2023;11(1):123.
85. Du Q, Ren B, Zhou X, Zhang L, Xu X. Cross-kingdom interaction between *Candida albicans* and oral bacteria. *Front Microbiol*. 2022;13:911623.
86. Pereira D, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY, Samaranyake LP. Is the oral fungal pathogen *Candida albicans* a cariogen? *Oral Dis*. 2018;24(4):518-26.
87. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun*. 2014;82(5):1968-81.
88. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, et al. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6357-67.
89. Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtzy M, Rohde M, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME J*. 2014;8(11):2256-71.
90. Xiao J, Huang X, Alkhers N, Alzamil H, Alzoubi S, Wu TT, et al. *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res*. 2018;52(1-2):102-12.
91. Lemos DR, Duffield JS. Tissue-resident mesenchymal stromal cells: Implications for tissue-specific antifibrotic therapies. *Sci Transl Med*. 2018;10(426).
92. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regen Med*. 2019;4:22.
93. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. 2021;184(15):3852-72.
94. Smith PC, Martínez C, Martínez J, McCulloch CA. Role of Fibroblast Populations in Periodontal Wound Healing and Tissue Remodeling. *Front Physiol*. 2019;10:270.
95. Wielento A, Lagosz-Cwik KB, Potempa J, Grabiec AM. The Role of Gingival Fibroblasts in the Pathogenesis of Periodontitis. *J Dent Res*. 2023;102(5):489-96.
96. Chen J, Xiong Y, Liu B, Li W. IL-6⁺ fibroblasts contribute to shaping the pro-inflammatory microenvironment in severe periodontitis after non-surgical periodontal therapy. *J Transl Med*. 2025;23(1):1109.
97. Lagosz-Cwik KB, Wielento A, Lipska W, Kantorowicz M, Darczuk D, Kaczmarzyk T, et al. hTERT-immortalized gingival fibroblasts respond to cytokines but fail to mimic primary cell responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Sci Rep*. 2021;11(1):10770.
98. Wielento A, Bereta GP, Łagosz-Ćwik KB, Eick S, Lamont RJ, Grabiec AM, et al. TLR2 Activation by *Porphyromonas gingivalis* Requires Both PPAD Activity and Fimbriae. *Front Immunol*. 2022;13:823685.
99. Alamoush RA, Kushnerev E, Yates JM, Satterthwaite JD, Silikas N. Response of two gingival cell lines to CAD/CAM composite blocks. *Dent Mater*. 2020;36(9):1214-25.
100. Beltrami R, Colombo M, Rizzo K, Di Cristofaro A, Poggio C, Pietrocola G. Cytotoxicity of Different Composite Resins on Human Gingival Fibroblast Cell Lines. *Biomimetics (Basel)*. 2021;6(2).
101. Della Rocca Y, Traini EM, Trubiani O, Traini T, Mazzone A, Marconi GD, et al. Biological Effects of PMMA and Composite Resins on Human Gingival Fibroblasts: An In Vitro Comparative Study. *Int J Mol Sci*. 2024;25(9).
102. Bunz O, Steegmann MC, Benz K, Testrich H, Quade A, Naumova EA, et al. Human Gingival Fibroblast Adhesion and Proliferation on Hydroxyapatite-Coated Zirconia Abutment Surfaces. *Materials (Basel)*. 2022;15(10).
103. Guillem-Martí J, Delgado L, Godoy-Gallardo M, Pegueroles M, Herrero M, Gil FJ. Fibroblast adhesion and activation onto micro-machined titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(7):770-80.

104. Angker L, Swain MV. Nanoindentation: Application to dental hard tissue investigations. *Journal of Materials Research*. 2006;21(8):1893-905.
105. Salomão PMA, Oliveira FA, Rodrigues PD, Al-Ahij LP, Gasque KCDS, Jeggle P, et al. The cytotoxic effect of TIF4 and NaF on fibroblasts is influenced by the experimental model, fluoride concentration and exposure time. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179471.
106. López-García S, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Pecci-Lloret MR, Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D. In Vitro Biocompatibility of CPP-ACP and Fluoride-containing Desensitizers on Human Gingival Cells. *Oper Dent*. 2021;46(6):E264-E75.
107. Seshadri VRA, Varghese NS, Gurunathan D. Evaluation of the Cytocompatibility of Fluoride Varnish and Its Effect on Human Gingival Fibroblasts (hGFs): An In Vitro Study. *Cureus*. 2023;15(7):e41735.
108. Mandava J, Reddy YS, Kantheti S, Chalasani U, Ravi RC, Borugadda R, et al. Microhardness and Penetration of Artificial White Spot Lesions Treated with Resin or Colloidal Silica Infiltration. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(4):ZC142-ZC6.
109. Arora TC, Arora D, Tripathi AM, Yadav G, Saha S, Dhinsa K. An In-Vitro evaluation of resin infiltration system and conventional pit and fissure sealant on enamel properties in white spot lesions. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2019;37(2):133-9.
110. Behrouzi P, Heshmat H, Hoorizad Ganjkar M, Tabatabaei SF, Kharazifard MJ. Effect of Two Methods of Remineralization and Resin Infiltration on Surface Hardness of Artificially Induced Enamel Lesions. *J Dent (Shiraz)*. 2020;21(1):12-7.
111. Sano H, Nakashima S, Songpaisan Y, Phantumvanit P. Effect of a xylitol and fluoride containing toothpaste on the remineralization of human enamel in vitro. *J Oral Sci*. 2007;49(1):67-73.
112. Prajapati D, Nayak R, Pai D, Upadhyaya N, K Bhaskar V, Kamath P. Effect of Resin Infiltration on Artificial Caries: An. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2017;10(3):250-6.
113. Saab YB, Kabbara W, Chbib C, Gard PR. Buccal cell DNA extraction: yield, purity, and cost: a comparison of two methods. *Genet Test*. 2007;11(4):413-6.
114. Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res*. 2009;43(6):474-83.
115. Freitas MCCA, Nunes LV, Comar LP, Rios D, Magalhães AC, Honório HM, et al. In vitro effect of a resin infiltrant on different artificial caries-like enamel lesions. *Arch Oral Biol*. 2018;95:118-24.
116. Issa AI, Preston K, Preston A, Toumba K, Duggal M. A study investigating the formation of artificial sub-surface enamel caries-like lesions in deciduous and permanent teeth in the presence and absence of fluoride. *Journal of Dental Research*. 2002;81:A138-A.
117. Zakizade M, Davoudi A, Akhavan A, Shirban F. Effect of Resin Infiltration Technique on Improving Surface Hardness of Enamel Lesions: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Evid Based Dent Pract*. 2020;20(2):101405.
118. Ayad AH, AbdelHafez MI, AlGhandour RN, Mustafa DS, Nour KA. Effect of different surface treatments on the microhardness and colour change of artificial enamel lesions. *Australian Dental Journal*. 2022;67(3):230-8.
119. Meyer-Lueckel H, Paris S, Kielbassa AM. Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration. *Caries Res*. 2007;41(3):223-30.
120. Li F, Liu XY, Zhang L, Kang JJ, Chen JH. Ethanol-wet bonding technique may enhance the bonding performance of contemporary etch-and-rinse dental adhesives. *J Adhes Dent*. 2012;14(2):113-20.
121. Subramaniam P, Girish Babu KL, Lakhota D. Evaluation of penetration depth of a commercially available resin infiltrate into artificially created enamel lesions: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2014;17(2):146-9.
122. Prasada KL, Penta PK, Ramya KM. Spectrophotometric evaluation of white spot lesion treatment using novel resin infiltration material (ICON). *J Conserv Dent*. 2018;21(5):531-5.

123. Fernando JR, Walker GD, Park TK, Shen P, Yuan Y, Reynolds C, et al. Comparison of calcium-based technologies to remineralise enamel subsurface lesions using microradiography and microhardness. *Sci Rep.* 2022;12(1):9888.
124. Shore RC, Kirkham J, Brookes SJ, Wood SR, Robinson C. Distribution of exogenous proteins in caries lesions in relation to the pattern of demineralisation. *Caries Res.* 2000;34(2):188-93.
125. Gomez SS, Bravo P, Morales R, Romero A, Oyarzun A. Resin Penetration in Artificial Enamel Carious Lesions after Using Sodium Hypochlorite as a Deproteinization Agent. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry.* 2014;39(1):51-6.
126. Jorge RC, Reis PPGD, Soviero VM. Understanding the Enamel Disintegration and Post-eruptive Breakdown of Demarcated Opacities on Molar Incisor Hypomineralisation. *Monogr Oral Sci.* 2024;32:88-99.
127. Chen M, Li JZ, Zuo QL, Liu C, Jiang H, Du MQ. Accelerated aging effects on color, microhardness and microstructure of ICON resin infiltration. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(18):7722-31.
128. Arslan S, Lipski L, Dubbs K, Elmali F, Ozer F. Effects of different resin sealing therapies on nanoleakage within artificial non-cavitated enamel lesions. *Dent Mater J.* 2018;37(6):981-7.
129. Toledano M, Osorio R, Osorio E, Prati C, Carvalho RM. Microhardness of acid-treated and resin infiltrated human dentine. *J Dent.* 2005;33(4):349-54.
130. Zimmerman B, Datko L, Cupelli M, Alapati S, Dean D, Kennedy M. Alteration of dentin-enamel mechanical properties due to dental whitening treatments. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2010;3(4):339-46.
131. Cuy J, Mann A, Livi K, Teaford M, Weihs T. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY.* 2002;47(4):281-91.
132. Oliver W, Pharr G. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *JOURNAL OF MATERIALS RESEARCH.* 2004;19(1):3-20.
133. Pretty IA, Ellwood RP. The caries continuum: opportunities to detect, treat and monitor the remineralization of early caries lesions. *J Dent.* 2013;41 Suppl 2:S12-21.
134. Murdoch-Kinch CA, McLean ME. Minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc.* 2003;134(1):87-95.
135. Toumba KJ, Twetman S, Splieth C, Parnell C, van Loveren C, Lygidakis N. Guidelines on the use of fluoride for caries prevention in children: an updated EAPD policy document. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2019;20(6):507-16.
136. Seppä L. Fluoride varnishes in caries prevention. *Med Princ Pract.* 2004;13(6):307-11.
137. Piesiak-Pańczyszyn D, Zakrzewski W, Piszko A, Piszko PJ, Dobrzyński M. Review on fluoride varnishes currently recommended in dental prophylaxis. *Polim Med.* 2023;53(2):141-51.
138. Vyavhare S, Sharma DS, Kulkarni VK. Effect of three different pastes on remineralization of initial enamel lesion: an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent.* 2015;39(2):149-60.
139. Li J, Xie X, Wang Y, Yin W, Antoun JS, Farella M, et al. Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: a systematic review. *J Dent.* 2014;42(7):769-77.
140. Shaik ZA, Rambabu T, Sajjan G, Varma M, Satish K, Raju VB, et al. Quantitative Analysis of Remineralization of Artificial Carious Lesions with Commercially Available Newer Remineralizing Agents Using SEM-EDX- In Vitro Study". *J Clin Diagn Res.* 2017;11(4):ZC20-ZC3.
141. Cardoso-Martins I, Pessanha S, Coelho A, Arantes-Oliveira S, Marques PF. Evaluation of the Efficacy of CPP-ACP Remineralizing Mousse in Molar-Incisor Hypomineralized Teeth Using Polarized Raman and Scanning Electron Microscopy-An. *Biomedicines.* 2022;10(12).
142. Tosco V, Vitiello F, Monterubbianesi R, Gatto ML, Orilisi G, Mengucci P, et al. Assessment of the Remineralizing Potential of Biomimetic Materials on Early Artificial Caries Lesions after 28 Days: An In Vitro Study. *Bioengineering (Basel).* 2023;10(4).

143. Poggio C, Arciola CR, Rosti F, Scribante A, Saino E, Visai L. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different restorative materials. *Int J Artif Organs*. 2009;32(9):671-7.
144. Arslan S, Zorba YO, Atalay MA, Özcan S, Demirbuga S, Pala K, et al. Effect of resin infiltration on enamel surface properties and *Streptococcus mutans* adhesion to artificial enamel lesions. *Dent Mater J*. 2015;34(1):25-30.
145. Chau NP, Pandit S, Jung JE, Jeon JG. Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *J Dent*. 2014;42(6):726-34.
146. Bachtiar EW, Bachtiar BM. Relationship between. *F1000Res*. 2018;7:1645.
147. Li Y, Saraithong P, Chen Z, Leung E, Pattanaporn K, Dasanayake A. Comparison of Real-Time Quantitative PCR with a Chairside Test for *Streptococcus Mutans* Assessment. *Chin J Dent Res*. 2017;20(4):199-210.
148. Jafari K, Hekmatfar S, Fereydunzadeh M. Comparison of Antimicrobial Activity of Conventional Fluoride Varnishes Containing Xylitol and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2018;8(4):309-13.
149. Chandak S, Bhondey A, Bhardwaj A, Pimpale J, Chandwani M. Comparative evaluation of the efficacy of fluoride varnish and casein phosphopeptide - Amorphous calcium phosphate in reducing. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016;6(5):423-9.
150. Matar MA, Darwish SS, Salma RS, Lotfy WA. Evaluation of the antibacterial activity of Enamelast® and Fluor defender® fluoride varnishes against *Streptococcus mutans* biofilm: an in vitro study in primary teeth. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2023;24(5):549-58.
151. Kammoun R, Zmantar T, Ghouil S. Scanning electron microscopy approach to observe bacterial adhesion to dental surfaces. *MethodsX*. 2020;7:101107.
152. Cugini C, Shanmugam M, Landge N, Ramasubbu N. The Role of Exopolysaccharides in Oral Biofilms. *J Dent Res*. 2019;98(7):739-45.
153. Kriswandini IL, Budi HS, Justitia FM. Examination of the Structure and Formation *Streptococcus mutans* Biofilm Induced by Glucose, Lactose, Soy Protein, and Iron. *Eur J Dent*. 2024;18(3):834-40.
154. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2006;51(11):1024-8.
155. Baraniya D, Chen T, Nahar A, Alakwaa F, Hill J, Tellez M, et al. Supragingival mycobiome and inter-kingdom interactions in dental caries. *J Oral Microbiol*. 2020;12(1):1729305.
156. Xiao J, Moon Y, Li L, Rustchenko E, Wakabayashi H, Zhao X, et al. *Candida albicans* Carriage in Children with Severe Early Childhood Caries (S-ECC) and Maternal Relatedness. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164242.
157. Koo H, Andes DR, Krysan DJ. *Candida-streptococcal* interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathog*. 2018;14(12):e1007342.
158. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000886.
159. Mousa HRF, Abiko Y, Washio J, Sato S, Takahashi N. and NCAC species: acidogenic and fluoride-resistant oral inhabitants. *J Oral Microbiol*. 2025;17(1):2473938.
160. Todorova V, Filipov I. One- and Two-Year Efficacy of Resin Infiltration and Remineralization for the Treatment of Initial Proximal Caries. *J Funct Biomater*. 2025;16(7).
161. Casaña-Ruiz MD, Velló-Ribes MA, Catalá-Pizarro M. Predictors of Clinical Success in Resin Infiltration for MIH Opacities. *J Clin Med*. 2025;15(1).
162. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. A scanning electronmicroscopy investigation of the structure of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 1994;40(6):416-23.
163. Staniszevska M, Bondaryk M, Swoboda-Kopec E, Siennicka K, Sygitowicz G, Kurzatkowski W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz J Microbiol*. 2013;44(3):813-21.

164. Vila T, Fonseca BB, DA Cunha MML, Dos Santos GRC, Ishida K, Barreto-Bergter E, et al. *Candida albicans* biofilms: comparative analysis of room-temperature and cryofixation for scanning electron microscopy. *J Microsc.* 2017;267(3):409-19.
165. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater.* 2007;23(1):34-9.
166. Batarseh G, Windsor LJ, Labban NY, Liu Y, Gregson K. Triethylene glycol dimethacrylate induction of apoptotic proteins in pulp fibroblasts. *Oper Dent.* 2014;39(1):E1-8.
167. Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, et al. TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res.* 2011;90(2):257-62.
168. Mendes Soares IP, Anovazzi G, Anselmi C, Leite ML, Scheffel DLS, Soares DG, et al. Response of pulp cells to resin infiltration of enamel white spot-like lesions. *Dent Mater.* 2021;37(6):e329-e40.
169. Meyer-Lueckel H, Hartwig C, Börner HG, Lausch J. Elution of Monomers from an Infiltrant Compared with Different Resin-Based Dental Materials. *Oral Health Prev Dent.* 2020;18(2):337-41.
170. Seshadri VRA, Varghese NS, Gurunathan D. Evaluation of the Cytocompatibility of Fluoride Varnish and Its Effect on Human Gingival Fibroblasts (hGFs): An In Vitro Study. *Cureus.* 2023;15(7):e41735.
171. Mao X, Auer DL, Buchalla W, Hiller KA, Maisch T, Hellwig E, et al. Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(8).
172. Pecci-Lloret MP, López-García S, Rodríguez-Lozano FJ, Álvarez-Novoa P, García-Bernal D. In Vitro Biocompatibility of Several Children's Toothpastes on Human Gingival Fibroblasts. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(5).
173. Dawood AE, Manton DJ, Parashos P, Wong RH, Singleton W, Holden JA, et al. Biocompatibility and Osteogenic/Calcification Potential of Casein Phosphopeptide-amorphous Calcium Phosphate Fluoride. *J Endod.* 2018;44(3):452-7.
174. Martinez MAF, Balderrama Í, Karam PSBH, de Oliveira RC, de Oliveira FA, Grandini CR, et al. Surface roughness of titanium disks influences the adhesion, proliferation and differentiation of osteogenic properties derived from human. *Int J Implant Dent.* 2020;6(1):46.

ПРИЛОГ 1

Стоматолошки факултет Универзитета у Београду
Клиника за дечју и превентивну стоматологију

Информације за родитеље/старатеље пацијената о истраживању „Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“

План и сврха истраживања

Ово истраживање има за циљ испитивање успешности примене различитих средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија зуба. За потребе овог истраживања користиће се здрави стални зуби (четворке или петице) који су извађени из ортодонтских разлога, према предвиђеном плану терапије.

Сматрамо да ће резултати овог истраживања допринети бољем разумевању и ефикаснијој клиничкој примени различитих препарата у терапији почетних каријесних лезија сталних зуба. Истраживање ће бити спроведено на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду, Пољопривредном факултету и Технолошко металуршком факултету Универзитета у Београду. За учешће у студији не постоји новчана надокнада.

Не постоји сукоб интереса од стране истраживача укључених у истраживање.

Након потписивања сагласности и завршетка планираног третмана, извађени зуби ће бити транспортовани на одговарајући начин у лабораторију Клинике за дечју и превентивну стоматологију Стоматолошког факултета ради даљег истраживања.

Значај истраживања

Могућа корист ове студије огледа се у ефикаснијем одабиру средстава у лечењу почетних каријесних лезија глеђи сталних зуба и бољем разумевању начина њиховог деловања.

Тајност података

Документација о пацијенту је строго поверљива. Увид у стоматолошки картон, осим ординирајућег лекара, имаће само истраживач (др Милена Милановић), а објављивање ће укључити анонимност података.

Пацијент ће благовремено бити обавештен ако нове информације буду доступне

Родитељ/Старатељ ће на време бити обавештен уколико дође до промена у истраживању или ако нове информације у науци и/или пракси буду доступне. Све информације ће моћи да добије од истраживача.

Добровољно учешће и услови повлачења из студије

Учествовање у студији је добровољно. Повлачење узорака је могуће у сваком тренутку из било ког разлога.

Контакт особа

Уколико желите додатне информације о овој студији, молимо Вас да се обратите др Милени Милановић (milena.milanovic@stomf.bg.ac.rs).

Хвала Вам на сарадњи.

Образац за информисани пристанак родитеља/старатеља за учешће пацијента у истраживању

САГЛАСНОСТ

Родитеља/старатеља за узимање узорка зуба у случају индикованог вађења сталног зуба (премолара) у истраживању „Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи”

Име и презиме детета	Број картона детета

Прочитао/ла сам (или ми је неко други прочитао) и у потпуности сам разумео/ла све наведене информације у документу **Информације за родитеље/старатеље пацијената**. Поставио/ла сам питања да решим било какве нејасноће и добио/ла одговарајуће одговоре. Добровољно дајем свој пристанак за коришћење извађеног сталног зуба мог детета/штићеника у предложеној студији. Неприхватање учешћа у овој студији или повлачење пристанка неће утицати на неопходну терапију мог детета/штићеника, тако да ће остварити своја законска права као пацијент. Својим добровољним пристанком за учешће мог детета/штићеника у предложеној студији нећу остварити никакву личну нити материјалну корист.

Име и презиме родитеља/старатеља: _____

Потпис родитеља/старатеља: _____

Потпис надлежног лекара: _____

Датум: _____

Информације за пацијенте за учешће у истраживању

„Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи“

План и сврха истраживања

Један од циљева овог истраживања је испитивање утицаја савремених средстава која се користе у терапији почетних каријесних лезија зуба на ткива која окружују зуб. За потребе овог истраживања користиће се део гингиве („десни“) величине 3x3x3 mm који ће бити узети приликом хируршког вађења умњака на Клиници за оралну хирургију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Након тога рана ће се ушити према стандардном протоколу.

Сматрамо да ће резултати овог истраживања допринети бољем разумевању и ефикаснијој клиничкој примени различитих препарата у терапији почетних каријесних лезија сталних зуба.

Истраживање ће бити спроведено на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду, Пољопривредном факултету и Технолошко металуршком факултету Универзитета у Београду.

За учешће у студији не постоји новчана надокнада.

Не постоји сукоб интереса од стране истраживача укључених у истраживање.

Након потписивања сагласности и завршетка планираног третмана, узорци ткива ће бити транспортовани на одговарајући начин у Имплантолошки истраживачки центар Стоматолошког факултета ради даљег истраживања.

Значај истраживања

Могућа корист ове студије огледа се у ефикаснијем одабиру средстава у лечењу почетних каријесних лезија глеђи сталних зуба и бољем разумевању начина њиховог деловања на ткиво које окружује зуб.

Тајност података

Документација о пацијенту је строго поверљива. Увид у стоматолошки картон, осим ординирајућег лекара, имаће само истраживач (др Милена Милановић), а објављивање ће укључити анонимност података.

Пацијент ће благовремено бити обавештен ако нове информације буду доступне

Пацијент ће на време бити обавештен уколико дође до промена у истраживању или ако нове информације у науци и/или пракси буду доступне. Све информације ће моћи да добије од истраживача.

Добровољно учешће и услови повлачења из студије

Учествовање у студији је добровољно. Повлачење узорака је могуће у сваком тренутку из било ког разлога.

Контакт особа

Уколико желите додатне информације о овом истраживању, молимо Вас да се обратите др Милени Милановић (milena.milanovic@stomf.bg.ac.rs).

Хвала Вам на сарадњи.

САГЛАСНОСТ

Пацијента за узимање узорка ткива гингиве у случају индикованог хируршког вађења умњака у истраживању „**Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи**”

Име и презиме пацијента

Број картона пацијента

Прочитао/ла сам (или ми је неко други прочитао) и у потпуности сам разумео/ла све наведене информације у документу **Информације за пацијенте за учешће у истраживању**. Поставио/ла сам питања да решим било какве нејасноће и добио/ла одговарајуће одговоре. Добровољно дајем свој пристапак за коришћење узорка ткива у предложеном истраживању.

Неприхватање учешћа у овој студији или повлачење пристапка неће утицати на неопходну терапију, тако да ћу остварити своја законска права као пацијент. Својим добровољним пристапком за учешће у предложеној студији нећу остварити никакву личну нити материјалну корист.

Потпис пацијента: _____

Потпис надлежног лекара: _____

Датум: _____

8. БИОГРАФИЈА

Милена Ж. Милановић рођена је 8. септембра 1992. у Крушевцу, Република Србија. У родном граду завршила је ОШ „Драгомир Марковић”, а потом и Гимназију са одличним успехом и носилац је дипломе „Вук Караџић”.

Стоматолошки факултет Универзитета у Београду уписала је 2011. године и завршила 2017. године са просечном оценом 9,77. Током студирања бавила се студентским научно-истраживачким радом, највише из области Дечје и превентивне стоматологије. Аутор и коаутор је неколико радова које је презентовала на студентским конгресима у земљи и иностранству. Носилац је „Colgate Palmolive Adria” стипендије за најбољег студента V године, стипендије „Доситеја” коју додељује Фонд за младе таленте Републике Србије, као и награде за најбољег дипломираног студента школске 2016/2017. године. Добитница је Повеље Ректора Универзитета у Београду за најбољег студента у генерацији Стоматолошког факултета Универзитета у Београду.

Током интегрисаних студија стоматологије била је један од главних организатора манифестације „Осмехом обасјај свет” у оквиру обележавања Светског дана оралног здравља, у Београду 2016. године. Исте године била је волонтер на 13. ЕАРД Конгресу (Сава Центар, Београд). Такође, учествовала је у организацији радионица на Фестивалу науке 2018. године „Авантуре једног зуба” и 2019. године „Стоматологија какву још ниси видео”.

Приправнички стаж обављала је на клиникама Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Након положеног стручног испита, 2018. године уписује Докторске академске студије – Базична и клиничка истраживања у стоматологији.

Од 2019. године ангажована је као сарадник у високом образовању на Клиници за дечју и превентивну стоматологију Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Током 2022. године уписује специјализацију из Превентивне и дечје стоматологије, а фебруара 2025. године полаже специјалистички испит са одличном оценом. Од јуна 2025. године добија звање асистента.

Учесница је пројекта „Примјена озона код хируршког вађења импактираних доњих трећих молара: утицај на појаву постоперативних компликација и процесе зарастања“, подржаном од стране Министарства за научнотехнолошки развој и високо образовање Републике Српске (број: 19.032/961-110/23).

Говори енглески и италијански језик. Активан је члан Српског лекарског друштва, Удружења стоматолога Србије и Стоматолошке коморе Србије. Од новембра 2023. године постаје сертификовани *iTOP (Individually Trained Oral Prophylaxis, Curaden Академија, Цирих, Швајцарска)* инструктор у циљу даљег рада на едукацији и унапређењу оралног здравља. Један је од аутора сета брошура под називом „Смернице за спровођење превентивних мера у дечјој стоматологији“ у оквиру пројекта „Подршка имплементацији програмских активности за унапређење оралног здравља деце и омладине у Републици Србији“ (уредник: проф. др Дејан Марковић).

Аутор је и коаутор 6 радова (2 категорије M21, 3 категорије M23 и 1 категорије M51) и више саопштења са скупова (8 категорије M34 и 32 категорије M64).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милена Милановић

Број индекса 4004/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милена Милановић

Број индекса 4004/2018

Студијски програм докторске академске студије

Наслов рада Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи

Ментор проф. др Милош Белоица, проф. др Биљана Миличић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање утицаја различитих третмана почетне каријесне лезије глеђи на формирање биофилма, адхезију и вијабилност ћелија хумане гингиве и вредности микротврдоће глеђи

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.